

Suplementación con sales cálcicas de aceite de lino a vacas lecheras en
primer tercio de lactancia: respuesta productiva y composición de leche

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Animal*

Yaliska Milena Moreno González

Ingeniera en Producción Animal - Universidad Católica Santa María la Antigua -
2014

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Estación Experimental
Agropecuaria Rafaela



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Buenos Aires

© Derechos de autor

Yaliska Milena Moreno González

2019

COMITÉ CONSEJERO

Director de Tesis

Eloy Eduardo Salado

Ingeniero Zootecnista, (FCA, Universidad Nacional de Lomas de Zamora)

Magister en Producción Animal, (FCA, Universidad Nacional de Mar del Plata)

Co-director de Tesis

Rafael Alejandro Palladino

Ingeniero Agrónomo, (FAUBA, Universidad de Buenos Aires)

Philosophie Doctor in Animal Science, (University College Dublin, República de Irlanda)

JURADO DE TESIS

JURADO

Irene Ceconi

Ingeniera Agrónoma (FCA, Universidad Nacional de Rosario)

Doctor of Philosophy, Nutrición de rumiantes (Univerisdad de Minnesota, Estados Unidos)

JURADO

Alejandro Mendoza

Ingeniero Agrónomo (Facultad de Agronomía- Universidad de la República, Uruguay)

Doctor en Producción Animal (Facultad de Veterinaria - Universidad de la República,
Uruguay)

JURADO

Darío Colombatto

Ingeniero Agrónomo (FAUBA, Universidad de Buenos Aires)

Philosophy Doctor in Animal Science (The Univerisity of Reading, Inglaterra)

Fecha de defensa de la tesis: 13 de mayo de 2019

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía
en cada uno de mis pasos

A mis padres por la motivación
y el apoyo incondicional que
me brindaron

A toda mi familia por su
apoyo y atención

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología en Innovación (SENACYT) por brindarme la oportunidad de poder realizar mis estudios de posgrado.

De modo muy especial, deseo hacer extensivo este agradecimiento a mis tutores de tesis Eloy Eduardo Salado y Rafael Alejandro Palladino, por integrarme a su equipo de trabajo, por su tiempo y dedicación incondicional a la asesoría de este trabajo.

A mis amigos y equipo de trabajo en INTA: Florencia Olmeda, Jesica Iorio y Dino Curletto, con quienes compartí una excelente experiencia durante la realización del trabajo de campo.

A todos mis amigos de la Fami-Inta por todo el cariño que me dieron y por haber compartido tanto tiempo como una gran hermandad.

A todo el personal de las instituciones académicas (FAUBA) y a las instituciones de investigación (INTA Rafaela e INTA Castelar) por sus aportes técnicos y su valiosa ayuda en la realización del trabajo de campo y de laboratorio.

A mis profesores por su participación en mi desarrollo profesional durante esta etapa y conocimientos brindados.

A mis compañeros de postgrado, especialmente a Georgina, Jesica, Margarita, por el tiempo compartido y el afecto recibido.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Yaliska Milena Moreno González

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción General	2
1.2 Objetivos	5
1.2.1 Objetivo General	5
1.2.2 Objetivos Específicos	5
1.3 Hipótesis	5
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Ácidos Grasos Poli-insaturados en productos de rumiantes y sus efectos en la salud	7
2.1.1 Lípidos: Generalidades	8
2.1.2 Ácidos Grasos en la leche	9
2.1.3 Ácidos Grasos Omega-3	13
2.1.4 Ácido Linoleico Conjugado (CLA)	15
2.2 Metabolismo ruminal de los lípidos	17
2.2.1 Lipólisis	18
2.2.2 Biohidrogenación ruminal	20
2.2.3 Síntesis de ácidos grasos bacterianos	22
2.2.4 Digestión y absorción de los ácidos grasos	22
2.3 Factores que afectan la concentración de ácidos grasos en la leche	23
2.3.1 Sistema de Alimentación	24
2.3.2 Suplementación en la dieta con fuentes lipídicas	24
2.3.3 Fuentes de lípidos protegidos	26
2.3.3.1 Efectos de la suplementación con lípidos protegidos sobre el consumo de materia seca (MS)	27
2.4 Impacto de la suplementación con lípidos protegidos sobre parámetros productivos	28
2.4.1 Utilización de fuentes provenientes de la semilla de lino en vacas lecheras	30
2.4.1.1 Efectos sobre la producción de leche	30
2.4.1.2 Efectos sobre la composición de la leche	31
2.4.1.2.1 Porcentaje de grasa butirosa	31
2.4.1.2.2 Porcentaje de proteína láctea	32
2.4.1.2.3 Perfil de ácidos grasos	34
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 Localización y unidad de análisis	37
3.2 Tratamientos	37
3.3 Mediciones	38
3.3.1 Sobre las vacas en producción	38

3.3.1.1 Producción de leche	38
3.3.1.2 Composición de leche	39
3.3.1.3 Variación de peso vivo y condición corporal	39
3.3.1.4 Consumo de materia seca y energía	39
3.3.1.5 Ambiente ruminal	40
3.3.2 Sobre los alimentos	41
3.3.2.1 Biomasa de forraje	41
3.3.2.2 Calidad de los alimentos	41
3.4 Análisis Estadístico	42
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	43
4.1 Características de la pastura y del concentrado	44
4.2 Consumo de MS	45
4.3 Variación de peso vivo y condición corporal	46
4.4 Ambiente ruminal	48
4.5 Producción y Composición de leche	49
4.6 Perfil de ácidos grasos en grasa butirosa	51
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
5.1 Características de la pastura y del concentrado	55
5.2 Consumo de pastura y concentrado	56
5.3 Variación de parámetros relacionados al peso vivo y estado corporal	58
5.4 Ambiente ruminal	59
5.5 Producción y Composición de leche	61
5.6 Perfil de ácidos grasos en leche	63
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	68
6.1 Conclusiones Generales	68
6.2 Implicancias	68
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 2.1	Clasificación de los ácidos grasos saturados e insaturados más comunes.	9
Tabla 2.2	Composición y perfil de AG (% del total de AG) de los productos y suplementos grasos utilizados en la nutrición de rumiantes.	18
Tabla 2.3	Factores asociados con las variaciones en la composición y concentración de CLA en leche y carne de rumiantes.	23
Tabla 3.4	Composición y cantidad diaria de concentrado suministrado a cada tratamiento.	38
Tabla 4.5	Composición química y digestibilidad de la pastura ¹ ofrecida a vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día ⁻¹) bajo la forma de sales cálcicas.	44
Tabla 4.6	Composición química de los alimentos utilizados y de la TMR.	44
Tabla 4.7	Consumo de MS en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día ⁻¹) bajo la forma de sales cálcicas.	45
Tabla 4.8	Ambiente ruminal en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con sales cálcicas de aceite de lino protegido (0,85 kg día ⁻¹).	48
Tabla 4.9	Producción y composición de la leche en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día ⁻¹) durante 10 semanas.	49
Tabla 4.10	Concentración de ácidos grasos en la GB de vacas en lactancia temprana suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día ⁻¹).	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Concentraciones de los AG de la leche (%) respecto a las concentraciones ideales.	2
Figura 2.1	Clasificación de los lípidos saponificables.	8
Figura 2.2	Estructura de un ácido graso.	9
Figura 2.3	Ácidos Grasos omega-3 y omega-6; PUFA= ácidos grasos poli-insaturados.	10
Figura 2.4	Configuración química de los ácidos grasos <i>cis</i> - y <i>trans</i> -	11
Figura 2.5	Riesgo relativo de enfermedades coronarias (CHD) con el aumento del consumo relativo del total de ácidos grasos (AG) <i>trans</i> o de productos derivados de rumiantes.	12
Figura 2.6	Esquema del metabolismo de los lípidos en el rumen: lipólisis y biohidrogenación.	19
Figura 2.7	Pasos clave en la conversión de lípidos esterificados a ácidos grasos saturados por lipólisis y biohidrogenación ruminal.	21
Figura 2.8	Modelo teórico que describe los cambios en la producción de leche al incrementar el porcentaje de lípidos en la dieta de vacas lecheras en lactancia. Comparado a una dieta control, la adición de lípidos puede causar aumento en la producción (+), disminución (-), o ningún cambio (línea plana).	29
Figura 2.9	Concentraciones de proteína láctea de vacas suplementadas con lípidos respecto al grupo con dietas control (línea basal, 100%).	32
Figura 4.10	Evolución del peso vivo en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día ⁻¹).	46
Figura 4.11	Evolución de la condición corporal en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día ⁻¹).	47
Figura 4.12	Evolución del tenor (a) de grasa butirosa (%) y la producción (b) de grasa butirosa (kg d ⁻¹) en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día ⁻¹).	50

ABREVIATURAS

AG	ácidos grasos
AG-Ca	sales cálcicas de ácidos grasos
AGMI	ácidos grasos mono-insaturados
AGPI	ácidos grasos poli-insaturados
AGS	ácidos grasos saturados
AL	ácido linoleico
ALN	ácido linolénico
AR	ácido ruménico
AV	ácido vaccénico
CLA	ácido linoleico conjugado
DHA	ácido docosahexaenoico
DPA	ácido docosapentaenoico
ENT	enfermedades no transmisibles
EPA	ácido eicosapentaenoico
HDL	lipoproteínas de alta densidad
LDL	lipoproteínas de baja densidad
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

El consumo de ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) como los omega-3 tiene efectos benéficos sobre la salud humana. La suplementación con AG omega-3 protegidos contra la digestión ruminal (lípidos pasantes) a vacas lecheras podría aumentar el contenido de estos AGPI benéficos en la leche incrementando su valor nutracéutico. El propósito de proteger estas grasas o aceites es para evitar su biohidrogenación ruminal, proceso por el cual los AGPI pueden verse alterados. Además, un exceso de grasa libre a nivel ruminal podría afectar la digestión de la fibra, disminuyendo el consumo de materia seca (CMS) entre otros efectos negativos. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del suministro de sales cálcicas (AGPI-Ca) de aceite de lino rico en omega-3 (ácido α -linolénico) sobre la producción y composición química de la leche y su valor nutracéutico en vacas lecheras en lactancia temprana. El período experimental tuvo una duración de 12 semanas. Se utilizaron 36 vacas Holando Argentino con $56,4 \pm 3,0$ días de lactancia, $586,8 \pm 15,4$ kg PV, $2,3 \pm 0,2$ lactancias y $37,7 \pm 1,5$ kg leche d^{-1} en un diseño en bloques completos aleatorizados. Los tratamientos fueron: 1) Omega-3 (**O3**): 12 kg MS $día^{-1}$ de **pastura de alfalfa** (*Medicago sativa*) + 13,5 kg MS $día^{-1}$ de **TMR** + 5,2 kg MS de **concentrado** incluyendo **0,85 kg d^{-1} de AG-Ca** de aceite de lino y 2) Control (**C**): dieta similar a O3 pero se reemplazó la suplementación con lípidos por grano de maíz molido de modo que las dietas fuesen **isoenergéticas**. No se detectó efecto de tratamiento ($P > 0,05$) para ninguna de las variables de producción y composición de leche, excepto para urea en leche que resultó levemente mayor en O3 ($P = 0,02$). La interacción tratamiento x semana resultó significativa ($P < 0,05$) para producción y contenido de grasa, con diferencias significativas sólo en la 3° semana del período experimental a favor del grupo C (1,39 vs. 1,13 kg d^{-1} y 3,86 vs. 3,23% para producción y tenor de grasa, respectivamente). Los consumos de MS total y de TMR resultaron similares ($P < 0,05$) entre tratamientos. El consumo de concentrado resultó mayor ($P < 0,01$) en C con respecto a O3. Se detectó una tendencia ($P = 0,06$) a un mayor consumo de MS de pastura en O3 con respecto a C. No se detectó efecto de tratamiento ($P > 0,05$) en los parámetros de ambiente ruminal evaluados. La suplementación con AGPI-CA redujo ($P < 0,05$) la fracción hipercolesterolémica de la leche ($C_{12:0}$, $C_{14:0}$ y $C_{16:0}$, -13,6%, - 7,4% y - 9%, respectivamente). La concentración de ácido α - linolénico ($C_{18:3\ n-3}$) aumentó significativamente (+ 108%, $P < 0,0001$) en O3 en relación al grupo C. La ausencia de efectos negativos de los lípidos sobre el tenor graso de la leche y la fermentación ruminal sugieren que la protección por saponificación resultó efectiva. La suplementación con AG-Ca de aceite de lino (0,85 kg $día^{-1}$) mejoró el valor saludable de la leche.

Palabras clave: vaca lechera, sales cálcicas de aceite de lino, ácido α -linolénico, valor nutracéutico, respuesta animal

ABSTRACT

The consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as omega-3 has beneficial effects on human health. The supplementation with omega-3 AG protected against ruminal digestion (bypass lipids) to dairy cows could increase the content of these beneficial PUFA in milk increasing its nutraceutical value. The purpose of protecting these fats or oils is to avoid ruminal biohydrogenation, a process by which PUFAs can be altered. In addition, an excess of free fat at the ruminal level could affect fiber digestion, decreasing dry matter intake (DMI) among other negative effects. The objective of this study was to determine the effect of the supply of calcium salts (PUFA-Ca) of flax oil rich in omega-3 (α -linolenic acid) on the production and chemical composition of milk and its nutraceutical value in dairy cows in early lactation. The experimental period lasted 12 weeks. A total of 36 Holando Argentino cows with 56.4 ± 3.0 days of lactation, 586.8 ± 15.4 kg PV, 2.3 ± 0.2 lactations and 37.7 ± 1.5 kg milk d⁻¹ were used in a randomized complete block design. The treatments were: 1) **Omega-3 (O3):** 12 kg DM day⁻¹ of **alfalfa pasture** (*Medicago sativa*) + 13.5 kg DM day⁻¹ of **TMR** + 5.2 kg DM of concentrate including **0.85 kg d⁻¹ of PUFA-Ca** of flax oil and 2) **Control (C):** diet similar to O3 but lipid supplementation was replaced by ground corn so that the diets were **isoenergetic**. No treatment effect was detected ($P > 0.05$) for any milk production and composition variables, except for urea in milk that was slightly higher in O3 ($P = 0.02$). The treatment x week interaction was significant ($P < 0.05$) for production and fat content, with differences only in the 3rd week of the experimental period in favor of group C (1, 39 vs. 1, 13 kg d⁻¹ and 3.86 vs. 3.23% for production and fat content, respectively). Total DMI and TMR were similar ($P < 0.05$) between treatments. Concentrate intake was higher ($P < 0.01$) in C compared to O3. Pasture DMI tended ($P = 0.06$) to be greater for cows that received the O3 treatment compared with C. No treatment effect was detected ($P > 0.05$) in rumen environment parameters. Supplementation with PUFA-Ca reduced ($P < 0.05$) the hypercholesterolemic fraction of milk (C12:0, C14:0 and C16:0, -13.6%, - 7.4% and - 9%, respectively). The concentration of α -linolenic acid (C_{18:3 n-3}) increased (108%, $P < 0.0001$) in O3 group compared with group C. The absence of negative effects of lipids on the fat content of milk and ruminal fermentation suggests that protection by saponification was effective. The supplementation with PUFA-Ca of flax oil (0.85 kg day⁻¹) improved the healthy value of the milk.

Key words: dairy cow, calcium salts of flax oil, α -linolenic acid, nutraceutical value, animal performance

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción General

La creciente conciencia pública sobre la implicancia que tienen algunos compuestos en la dieta sobre la salud humana (vitaminas, ácidos grasos (**AG**), flavonoides, entre otros) y que están relacionados con la seguridad alimentaria, ha incrementado la demanda de los consumidores para obtener alimentos naturalmente saludables.

Los productos de origen animal han desempeñado un papel importante debido a la composición de los AG que pueden influir en la salud humana y en particular, algunos AG que sólo se producen naturalmente en los productos de rumiantes (Ribeiro *et al.*, 2011). Un factor determinante en la calidad nutricional de la leche es su composición en AG, ya que se ha demostrado que algunos de ellos ejercen un impacto positivo en la salud. Consecuentemente, ha aumentado el interés en agregar valor a la leche y a los productos lácteos aumentando los niveles de AG poli-insaturados (**AGPI**) específicos, como el ácido linoleico (**AL**) y ácido α -linolénico (**ALN**), por sus propiedades beneficiosas (Brzóśka *et al.*, 1999; Wijendran y Hayes, 2004).

Los productos provenientes de rumiantes se caracterizan por una concentración elevada de AG saturados (**AGS**) y una concentración moderada a baja de AG mono-insaturados (**AGMI**) y AGPI (Figura 1.1). Se estima que la grasa de la leche de los rumiantes tiene más de 400 AG diferentes y sus respectivos isómeros, y esto se relaciona en gran parte con el metabolismo lipídico extenso que ocurre en el rumen (Jensen, 2002). El contenido de AGS de la leche es aproximadamente 70% (Jenkins y McGuire, 2006), principal razón por la cual aumenta la necesidad de modificar su perfil hacia uno más insaturado. Los AGS de cadena media láurico ($C_{12:0}$), mirístico ($C_{14:0}$) y palmítico ($C_{16:0}$) son nutricionalmente indeseables por sus efectos hipercolesterolémicos, es decir, que incrementan el contenido de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (**LDL**), las cuales están asociadas con un incrementado riesgo cardiovascular por afecciones coronarias (Stockdale *et al.*, 2003). En ese sentido, la demanda de los consumidores por los AG insaturados asociados a dietas saludables es una fuerza importante detrás del cambio del perfil de AG de la leche (Offer *et al.*, 1999).

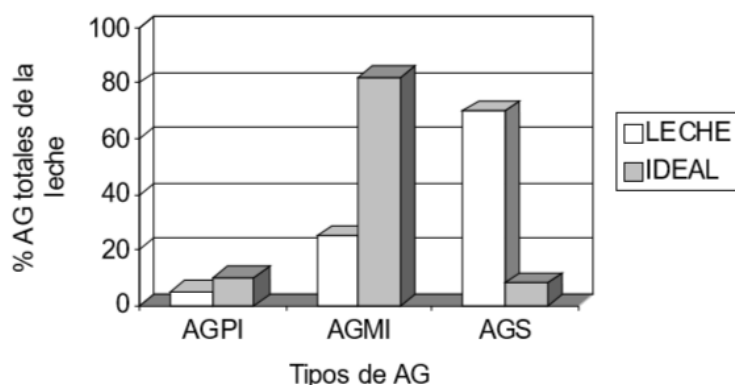


Figura 1.1 Concentraciones de los AG de la leche (%) respecto a las concentraciones ideales. Fuente: adaptado de O'Donnell (1989)

Los AGPI de cadena larga están compuestos principalmente por dos familias de AG esenciales: omega-3 y omega-6. Los principales AG omega-6 y omega-3 de la dieta son el AL ($C_{18:2n-6}$) y el ALN ($C_{18:3n-3}$), respectivamente. Se ha enfocado atención especial sobre el ALN ($C_{18:3n-3}$) por tener efectos potencialmente cardioprotectores (Hu *et al.*, 2001), asociados a una menor incidencia de hipertensión, inflamación y aterosclerosis

(Williams, 2000; Wijendran y Hayes, 2004). Por otro lado, si bien el AL ($C_{18:2n-6}$) es precursor de la serie de ácidos grasos omega-6, se recomienda una relación omega-6: omega-3 menor a 5:1 en la dieta. Se ha sugerido que relaciones mayores estarían asociadas con el desarrollo de enfermedades tumorales, cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunes y neurodegenerativas (Simopoulos, 2004).

La investigación ha demostrado varios beneficios de los AG omega-3 ($C_{18:3-n3}$) en la salud humana, relacionado con una disminución en la incidencia de cáncer, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, artritis y una mejora en la capacidad visual (Simopoulos, 2008). De la misma manera, el ALN ($C_{18:3-n3}$), promueve el aumento en el contenido de ácido linoleico conjugado (CLA), mientras que disminuye el contenido de AGS en leche (Chilliard *et al.*, 2007). Asimismo, se ha demostrado una variedad de efectos benéficos de los CLA sobre la salud humana que incluye propiedades antiaterogénicas y antiproliferativas (Bauman *et al.*, 2001). La semilla de lino contiene un 50% de ALN ($C_{18:3-n3}$) en el aceite, por lo que una suplementación con esta semilla podría incrementar las cantidades de este AG en la leche como se ha demostrado en algunos trabajos (Focant *et al.*, 1998, Dhiman *et al.*, 2000, Petit *et al.*, 2001, Ward *et al.*, 2002, Petit *et al.*, 2004).

Durante los últimos 30 años, varias publicaciones se han centrado en describir el perfil de AG de la leche de vacas alimentadas con distintos tipos de dieta utilizando diferentes fuentes de grasas (Glasser *et al.*, 2008; Moallem, 2009; Petit y Côrtes, 2010). Sin embargo, a pesar de los datos publicados, todavía no se ha concluido claramente sobre la forma en la que los factores asociados a la alimentación o a los animales influyen en el contenido de grasa en leche y en su perfil lipídico (Suksombat *et al.*, 2013).

A su vez, las grasas han generado interés en la nutrición animal, particularmente en dietas de vacas lecheras de alta producción, no sólo para aumentar la concentración energética de las dietas y mejorar los rendimientos productivos (Palmquist, 1996), sino también porque podrían influir positivamente sobre la reproducción (Staples *et al.*, 1998). En particular, se ha sugerido que el uso de AG omega-3 podría mejorar la performance reproductiva como consecuencia de una disminución de las pérdidas embrionarias (Mattos *et al.*, 2000).

Los antecedentes muestran que la composición de AG de la leche en vacas lecheras, se puede modificar mediante la suplementación con aceites provenientes de semilla oleaginosas ricas en AGPI (Hagemeister *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1970;). En el estudio de Scott *et al.*, (1970), reportaron que el ALN ($C_{18:3-n3}$) contenido en la grasa láctea de vacas lecheras, se incrementó desde 1.1% a 21.9% al suplementar 1.5 g de aceite de semilla de lino tratada con formaldehído.

Por otro lado, Glasser *et al.*, (2008) reportaron que la suplementación con semillas de lino en vacas lecheras, aumentó las proporciones de (CLA) y de los AG cis-9, trans-11 $C_{18:2}$ en la grasa láctea, a pesar de que la proporción de ALN ($C_{18:3-n3}$; cis-9, cis-12, cis-15) en la grasa láctea de las vacas suplementadas con ALN ($C_{18:3-n3}$) proveniente de semilla de lino entera (Petit, 2002) no excedía el 1% de los AG total. No obstante, cuando realizó una infusión en el intestino delgado de vacas lecheras, utilizando grasa by-pass proveniente de aceite de lino, las concentraciones de ALN ($C_{18a:3-n3}$) alcanzaron el 14% de los AG totales en la grasa láctea (Petit *et al.*, 2002). Por lo tanto, existe la posibilidad de aumentar el contenido de AG omega-3 de la grasa láctea, cuando el ALN ($C_{18a:3-n3}$) está protegido contra la biohidrogenación ruminal.

Modificar la composición de AGPI en la leche implica una gran complejidad debido a que los AG insaturados provenientes de la dieta se convierten a AGS durante el proceso de biohidrogenación ruminal (Griinari y Bauman, 1999), el cual limita el contenido de AG insaturados en la leche, lo que resulta en pequeños cambios en la composición de AG

de los lípidos dietarios a nivel duodenal (Avila *et al.*, 2000). Además, cantidades excesivas de AG insaturados en la dieta tienen un efecto negativo sobre el funcionamiento ruminal, disminuyendo la digestibilidad de la fibra y la relación acetato-propionato (Chilliard, 1993; Harvatine y Allen, 2006), aunque al mismo tiempo reduciendo las pérdidas de metano (Beauchemin *et al.*, 2009).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, se ha pensado que los efectos beneficiosos de suplementar con lípidos en las dietas de vacas lecheras se pueden mejorar si se protegen contra la extensa biohidrogenación ruminal. Por esta razón, se han desarrollado diversas técnicas industriales para proteger los lípidos y evitar posibles modificaciones en el proceso de la fermentación ruminal. Una de ellas es la protección por saponificación, en la cual los AG de cadena larga son transformados en sales cálcicas (**AGPI-Ca**). Dichas AG-Ca son insolubles a pH ruminal (6,0-6,5), pero en las condiciones de acidez del tracto post-ruminal los AG se liberan del calcio quedando disponibles para la absorción intestinal (Jenkins y Palmquist, 1984). Así, mientras el enlace con Ca se mantenga en el rumen, los AG no interfieren con la población microbiana (Jenkins, 2016). Utilizando estos lípidos caracterizados por tener un efecto inhibitorio mínimo sobre el metabolismo microbiano ruminal (Fuentes Álvarez, 2009), la digestión del resto de los componentes de la dieta, en especial de la fibra, no se vería alterada.

En un estudio realizado por Brzóska, (2006), se reportó que las proporciones de ALN (C_{18a:3-n3}) aumentaron de 1,20 a 2,25 g/100 g de AG en grasa láctea de vacas lecheras alimentadas con 0 a 5,4% de AG-Ca de aceite de lino en la materia seca de la dieta, aunque la protección contra la biohidrogenación ruminal de los AGPI condujo a un aumento en la proporción de CLA.

Este trabajo de tesis, forma parte de un proyecto global en el que se evaluó el impacto del consumo de ácidos grasos omega-3 sobre la respuesta productiva, el perfil de AG y el comportamiento reproductivo en vacas lecheras en pastoreo en inicio de lactancia.

Existe información limitada sobre el efecto de la suplementación con AG-Ca de aceite de lino en el contexto de sistemas pastoriles, que aborde simultáneamente aspectos sobre el desempeño productivo y reproductivo en vacas lecheras. Por lo anteriormente expuesto, y considerando los sistemas de producción pastoriles, en donde el consumo de ácido linolénico basal es alto, surge la siguiente interrogante:

¿Qué efectos tiene la suplementación con lípidos protegidos, ricos en omega-3, sobre los parámetros productivos y la calidad nutracéutica de la leche en vacas lecheras en pastoreo?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Determinar los efectos de la suplementación con sales cálcicas (AGPI-Ca) de aceite de lino a vacas lecheras en primer tercio de lactancia alimentadas con raciones parcialmente mezcladas sobre parámetros productivos y el perfil de ácidos grasos de la leche.

1.2.2 Objetivos Específicos

Conocer el efecto de la suplementación con AGPI-Ca de aceite de lino sobre:

- ✓ Producción y composición química de la leche.
- ✓ Consumo de materia seca.
- ✓ Variación de peso vivo y condición corporal.
- ✓ Parámetros de ambiente ruminal: pH, NH₄-N y ácidos grasos volátiles.
- ✓ Perfil de ácidos grasos de la leche.

1.3 HIPÓTESIS

La suplementación con lípidos protegidos bajo la forma de sales cálcicas de aceite de lino a vacas lecheras en primer tercio de lactancia alimentadas con raciones parcialmente mezcladas:

H₁: No afectará negativamente la producción y composición de la leche debido a que la protección ruminal de los ácidos grasos insaturados evitará modificaciones del ambiente ruminal que potencialmente podrían impactar sobre la digestión de la fibra y el consumo de materia seca.

H₂: Mejorará el valor saludable de la leche debido a que la protección de los lípidos contra la digestión ruminal permitirá una mayor transferencia del ácido α -linolénico contenido en el aceite de lino a la glándula mamaria.

CAPÍTULO 2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácidos Grasos Poli-insaturados en productos de rumiantes y sus efectos en la salud

La grasa se percibe como el nutriente "perjudicial" de todos los alimentos, vinculado a las enfermedades no transmisibles (**ENT**), que son afecciones de larga duración con una progresión generalmente lenta, conocidas también como enfermedades crónicas. Las ENT han sido identificadas como la principal amenaza para la salud humana (OMS, 2017a), incluyendo las enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, y enfermedades respiratorias crónicas. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. La estadística muestra que en 2012 murieron 17,5 millones de personas por esta causa, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. De estas muertes, 7,4 millones se debieron a la cardiopatía coronaria, y 6,7 millones, a los accidentes vasculares cerebrales (OMS, 2017a).

La causa más frecuente de los ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares es la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el corazón o el cerebro. Sin embargo, dichas afecciones son causadas también por una combinación de factores de riesgo, tales como el tabaquismo, las dietas desequilibradas y la obesidad, la inactividad física, el consumo nocivo de alcohol, la hipertensión arterial, la diabetes y la hiperlipidemia (OMS, 2017a). En la Argentina, la obesidad y sobrepeso afecta al 58% de la población, lo que estaría relacionado con dietas no saludables y con la inactividad física. Durante el período 2005-2013, la prevalencia de obesidad aumentó un 42%, al pasar de un 15% a un 21% (OPS/OMS, 2016). De la misma manera, las estadísticas muestran que en el año 2003, el 52% de las muertes fueron por causas cardiovasculares y cáncer (Ferrante y Virgolini, 2007).

Sobre estas consideraciones, existe un creciente interés por aumentar los AGPI, particularmente el omega-3 y el CLA, en la dieta, por los distintos efectos biológicos que ejercen sobre las funciones cardíacas y plasmáticas en los seres humanos (Wijendran y Hayes, 2004). Un mayor consumo de AG omega-3 estaría relacionado con un baja incidencia de las enfermedades cardiovasculares, hipertensión y artritis (Simopoulos, 2002). De la misma manera, se han demostrado otros efectos asociados a estos AGPI como el de reducir el riesgo de contraer diabetes tipo 2, cáncer y ciertos trastornos en las funciones neurológicas (Lock y Bauman, 2004). De igual forma, el CLA ha demostrado ser beneficioso para la salud humana debido a sus propiedades anticancerígenas, antiaterogénicas, antidiabéticas y antiadipogénicas.

Los AGPI de cadena larga (*eicosapentaenoico*; **EPA**) y (*docosahexaenoico*; **DHA**) ejercen un papel importante en el transporte de lípidos y en la actividad de ciertas enzimas lipoproteicas. También, son los precursores de compuestos biológicamente activos llamados eicosanoides que incluyen las prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos (Velásquez, 2006). Estos compuestos regulan funciones vitales como la presión arterial, la coagulación sanguínea, y las respuestas tanto inflamatorias como inmunes.

La fuente predominante de los CLA en las dietas humanas son los productos derivados de rumiantes, principalmente carne y leche. De la misma manera, el ALN, EPA y DHA se pueden encontrar en los tejidos de rumiantes, aunque las concentraciones son generalmente más bajas que en los productos marinos.

2.1.1 Lípidos: Generalidades

Los lípidos (*del griego: lipos, grasa*) conforman un conjunto heterogéneo de sustancias de origen biológico, que se encuentran en los tejidos vegetales y animales, formados en su mayoría por átomos de carbono, hidrógeno y en menor proporción, oxígeno. Son insolubles en agua y fácilmente solubles en disolventes orgánicos (éter, cloroformo, hexano, entre otros). Los lípidos son la reserva energética más significativa de los animales, almacenándose en el cuerpo como triglicéridos en el tejido adiposo. También, sirven como material aislante y estructural, de manera tal, que puedan ser utilizados por las células para la formación de membranas (Koolman y Röhm, 2005).

Los lípidos se pueden clasificar en dos grupos: saponificables (son hidrolizables mediante el calor y álcali, resultando sales de AG) e insaponificables. A su vez, los lípidos saponificables pueden clasificarse en: simples y compuestos (Figura 2.1).

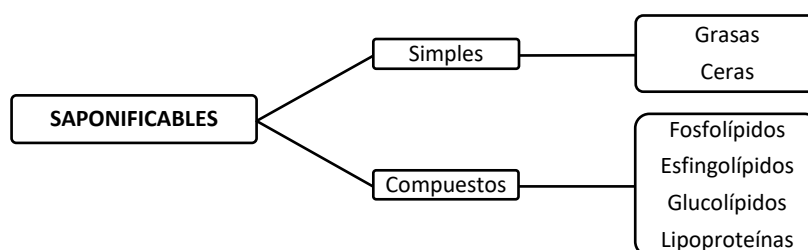


Figura 2.1. Clasificación de los lípidos saponificables. Fuente: reorganizado por la investigadora (2017).

Dentro de las propiedades físicas más importantes de los lípidos se considera el punto de fusión y la solubilidad. El punto de fusión determina si el lípido estará en forma líquida o sólida a temperatura ambiente. Por la presencia de dobles enlaces, los AG insaturados son más reactivos químicamente que los AGS. El punto de fusión depende principalmente del grado de saturación y en menor grado de la longitud de la cadena de carbonos.

Las grasas alimentarias (sólidas) o aceites (líquidos) más frecuentes son una mezcla de triglicéridos con cantidades menores de otros lípidos (FAO/OMS, 1997). El conjunto de los lípidos presentes en los alimentos consumidos recibe comúnmente el nombre de grasa de la dieta. Tanto en los alimentos como en el cuerpo humano, existen varias clases de lípidos: los triglicéridos, fosfolípidos, glicolípidos y los éteres de colesterol. Desde el punto de vista alimentario, los componentes lipídicos de mayor importancia son los triglicéridos. Estos compuestos son ésteres de glicerol con AG que tienen un gran contenido energético y forman parte de todos los aceites y grasas que se conocen. Los fosfolípidos y glicolípidos son lípidos complejos esenciales que forman parte de la membrana celular, con funciones estructurales y fisiológicas. Los éteres de colesterol también forman parte la membrana y su interés biológico radica en que además de formar membranas, son precursores de esteroides hormonales, ácidos biliares y vitamina D (Mataix, 2004).

A los triglicéridos se les denomina de forma genérica como grasas, aunque normalmente se distinguen dos tipos: grasas y aceites (Fuller, 2008). Los aceites, son grasas líquidas a temperatura ambiente, y son normalmente de origen vegetal, aunque existen excepciones como los aceites marinos. Las grasas suelen ser lípidos sólidos a temperatura ambiente y son de origen animal: por ejemplo, la manteca (derivado del ganado porcino) y el sebo (derivado del ganado vacuno, ovino y equino).

2.1.2 Ácidos Grasos en la leche

Los AG son los componentes básicos estructurales de los lípidos saponificables (Rivera, 2008) y están formados por una cadena hidrocarbonada de varias longitudes (entre 4 y 22), que tienen en uno de los extremos un grupo carboxilo (ácido orgánico - COOH), y en el otro un grupo metilo (-CH₃) (Figura 2.2). El número de átomos de carbono en la mayoría de los AG es siempre par, debido a que su síntesis tiene lugar a partir de unidades de dos carbonos (C₂).

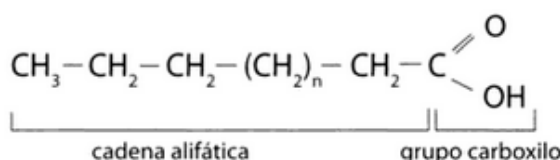


Figura 2.2 Estructura de un ácido graso. Fuente: Velásquez, (2006)

Según el número total de carbonos se diferencian los AG de cadena corta (C_{4:0} a C_{8:0}), media (C_{10:0} a C_{16:0}), o larga (C_{18:0} a C_{24:0}) (Tabla 2.1). En función de la presencia o no de dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada se diferencian los AGS (no poseen dobles enlaces) y AG insaturados, los cuales se clasifican en AGMI (poseen un doble enlace) y AGPI (presentan dos o más dobles enlaces). En los AG insaturados con el mismo número de dobles enlaces, se puede distinguir la presencia de isómeros de posición de los dobles enlaces, teniendo una importancia particular la localización del primer doble enlace, contando a partir del extremo CH₃ de la cadena hidrocarbonada, nombrándola como omega o “n” (Rivera, 2008). Por ejemplo, C_{18:3n3} donde: 18 es el número de carbonos, 3 es el número del doble enlace y n-3 indica que el primer doble enlace se encuentra en el tercer carbono desde el extremo CH₃.

Tabla 2.1 Clasificación de los ácidos grasos saturados e insaturados más comunes.

Ácidos	Nombre abreviado	Serie
<i>Saturados</i>		
Caproico	C6:0	-
Caprílico	C8:0	-
Cáprico	C10:0	-
Laúrico	C12:0	-
Mirístico	C14:0	-
Palmítico	C16:0	-
Estéarico	C18:0	-
Araquídico	C20:0	-
Behénico	C22:0	-
<i>Insaturados</i>		
Palmitoleico	C16:1 cis-9	n-7
Oleico	C18:1 cis-9	n-9

Linoleico	C18:2 cis-9,cis-12	n-6
Linolénico	C18:3 cis-9,cis-12,cis-15	n-3
Eicosapentaenoico	C20:5 cis-5,cis-8,cis-11,cis-14,cis-17	n-3
Docosahexaenoico	C22:6 cis-4,cis-7,cis-10,cis-13,cis-16,cis-19	n-3

Fuente: Adaptado de Martínez, (2010)

En los lípidos dietarios, los AGMI más abundantes pertenecen a la familia de AG omega-9 ($C_{18:1n-9}$; ácido oleico), mientras que, los AGPI más frecuentes pertenecen a la familia omega-6 ($C_{18:2n-6}$) y omega-3 ($C_{18:3n-3}$) (Figura 2.3).

De igual forma, los AG insaturados pueden presentar diferentes configuraciones geométricas (estereoisomería). Es importante la diferenciación de isómeros en función de la disposición de los átomos de hidrógeno unidos a los carbonos del doble enlace, dando lugar a los isómeros *cis*- (los dos átomos de hidrógeno se disponen en el mismo lado de los carbonos del doble enlace) o *trans*- (los átomos de hidrógeno se disponen uno a cada lado del doble enlace (Figura 2.4). Por lo tanto, *cis*-9 *trans*-11 $C_{18:2n-7}$ indica el AG que tiene 18 carbonos con 2 dobles enlaces, el primero entre el carbono 9 y el carbono 10 en la posición *cis*- y el segundo entre el carbono 11 y el carbono 12 en posición *trans*-, y el primer doble enlace contando desde el extremo CH_3 (posición omega) está situado en el C_7 (Roca *et al.*, 2011).

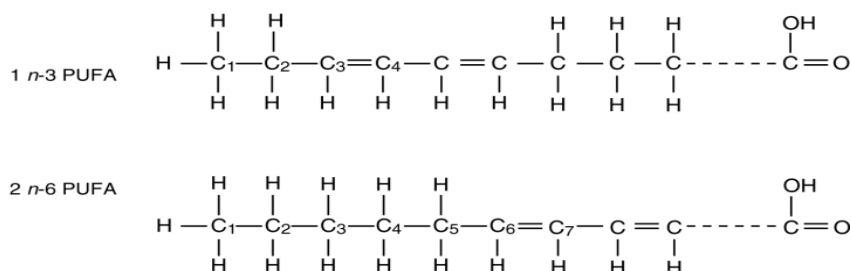


Figura 2.3 Ácidos grasos omega-3 y omega-6; PUFA= ácidos grasos poli-insaturados. Fuente: Lunn y Theobald, (2006)

Algunos AG no pueden ser sintetizados de forma endógena por los seres humanos o los animales y deben ser obtenidos de la dieta, lo cual se conocen como AG esenciales, particularmente el AL ($C_{18:2n-6}$) y el ALN ($C_{18:3n-3}$). El $C_{18:3n-3}$ es esencial para el crecimiento y precursor de la síntesis de AG de cadena larga: EPA ($C_{20:5n-3}$) y DHA ($C_{22:6n-3}$), que, junto con el ácido araquidónico, pueden ser sintetizados a partir del $C_{18:3n-3}$ y $C_{18:2n-6}$ respectivamente, mediante reacciones de desaturación o elongación catalizadas por enzimas.

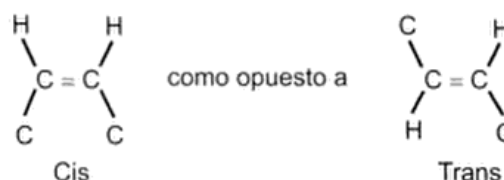


Figura 2.4 Configuración química de los ácidos grasos *cis*- y *trans*-.
Fuente: Melo *et al.*, (2007)

En los rumiantes, la grasa de la leche tiene una composición única debido a la diversidad de AG que la compone. Entre el 40-60% de los AG de la leche son de cadena larga que se derivan de la dieta, predominando el ácido estearico (C_{18:0}). Los AG de cadena corta (C_{4:0} a C_{8:0}) y media (C_{10:0} a C_{16:0}) se sintetizan *de novo* en la glándula mamaria, mientras que, el C_{16:0} puede originarse tanto de la dieta como de la síntesis *de novo* (Palmquist, 2006).

Algunos AG pueden resultar perjudiciales para la salud humana. El consumo de AGS de cadena media (láurico ($C_{12:0}$), mirístico ($C_{14:0}$) y palmítico ($C_{16:0}$)) aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Martínez *et al.*, 2013). Además de esto, los AGS de cadena media presentes tanto en las grasas animales como en los aceites vegetales, que son bastante utilizados en la industria alimentaria, incrementan la concentración total del colesterol plasmático (LDL). Sin embargo, no todos los AGS tienen efectos negativos sobre la salud; por ejemplo, el ácido butírico ($C_{4:0}$) parece tener un efecto protector frente al cáncer de colon (Parodi, 1999) y el $C_{18:0}$ no afecta negativamente los niveles de colesterol plasmático (St John *et al.*, 1991).

Los AG de configuración *trans- no conjugados*, derivados principalmente de aceites vegetales parcialmente hidrogenados (producidos sintéticamente), pueden influir negativamente en la salud humana, mientras que los AG *trans- conjugados*, producidos naturalmente por los rumiantes, pueden tener efectos positivos en la salud humana, por ejemplo, el CLA (Park y Pariza, 2007; 2009). Dependiendo de la fuente de AG *trans-* (industrial o productos derivados de rumiantes), se ha demostrado diferencias en cuanto al riesgo relativo de presentar enfermedades coronarias (Figura 2.5).

La adición de AGPI a la dieta conduce a la formación de muchos compuestos intermedios de la biohidrogenación ruminal, en interacción con el ecosistema microorganismos ruminal (Jenkins *et al.*, 2007), incluyendo AG *trans*- y precursores de CLA. En la grasa de la leche se producen naturalmente 14 isómeros de CLA (Lock y Bauman, 2004) y las investigaciones han mostrado particular relevancia en los isómeros: *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 por sus efectos biológicos. Algunos efectos podrían ser específicos de los distintos isómeros, de manera tal que el *cis*-9 *trans*-11, más abundante en la leche y los tejidos de rumiantes, parece ser el más eficaz como agente anticarcinogénico, mientras que el *trans*-10 *cis*-12 sería el más efectivo por sus efectos sobre los adipocitos (Pariza *et al.*, 2001; Brown, 2003) y se ha demostrado también que este isómero podría contribuir con la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y lipodistrofia (Brown, 2003). De igual forma, el ácido oleico (C_{18:1} *cis*-9) y ácido vaccénico (**AV**; C_{18:1} *trans*-11) reducen el riesgo de enfermedad cardiovascular (Benito *et al.*, 2006; Field *et al.*, 2009) y además de esto, el AV es precursor del ácido ruménico (**AR**; C_{18:2} *cis*-9 *trans*-11), al que se le ha atribuido propiedades anticarcinógenas y antiaterogénicas (Parodi, 1999; Bauman *et al.*, 2006; Benjamin y Spener, 2009). Se ha demostrado que la concentración de CLA en leche se puede mejorar en vacas lecheras en pastoreo cuando

son suplementadas con aceites de AGPI, provocando una disminución en la concentración de AG de cadena corta y media (AbuGhazaleh y Holmes, 2007; Schroeder *et al.*, 2004).

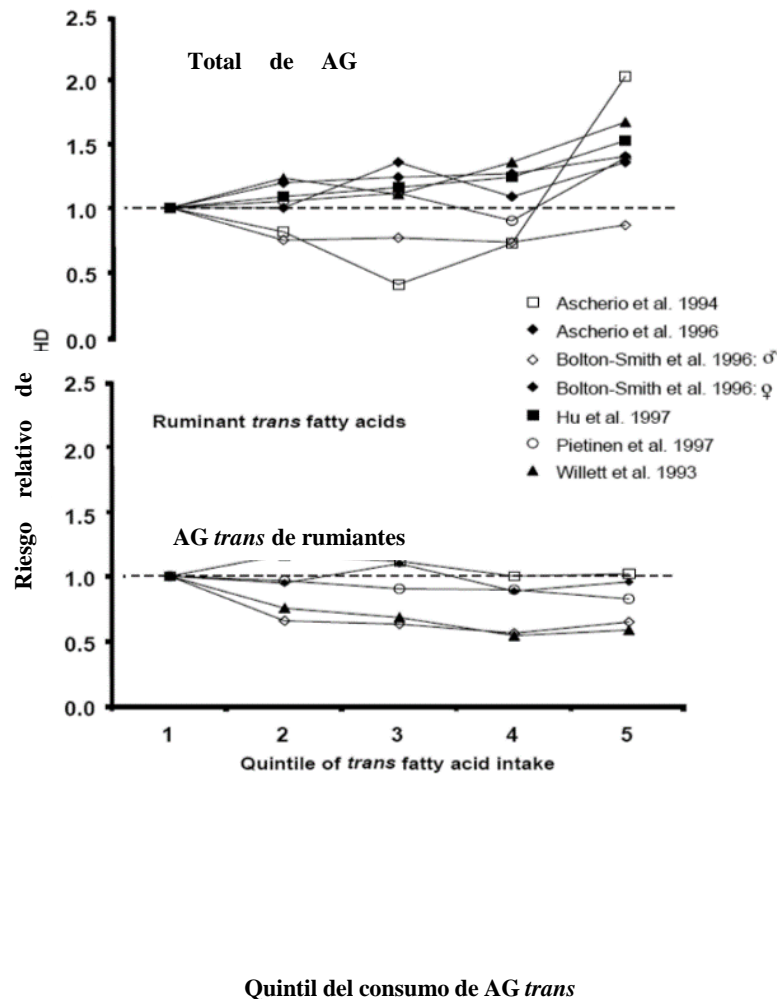


Figura 2.5 Riesgo relativo de enfermedades coronarias (CHD) con el aumento del consumo relativo del total de ácidos grasos (AG) *trans* o de productos derivados de rumiantes. Fuente: Ribeiro *et al.* (2011)

Contrariamente, se ha demostrado que el incremento de algunos AG insaturados *trans* pueden ser perjudiciales para la salud (Simopoulos, 1999). Algunos estudios muestran que los AG *trans*-9 y *trans*-10 C_{18:1} aumentan potencialmente las concentraciones plasmáticas de colesterol total y las LDL (Mensink y Katan, 1990), efecto desfavorable que se correlaciona positivamente con un mayor riesgo de enfermedades coronarias (Roy *et al.*, 2007; Gebauer *et al.*, 2011) en comparación con los *trans*-11 C_{18:1} (Willett, 1993). Además de esto, los AG *trans* interfieren con la desaturación y el alargamiento de los AG omega-6 y omega-3, disminuyendo así la cantidad de ácido araquidónico, EPA y disponibilidad de DHA para el funcionamiento metabólico en el ser humano (Simopoulos 1995 en Spiller, 1995).

2.1.3 Ácidos Grasos Omega-3

Los AG omega-3 son una familia de AGPI que contribuyen de manera positiva en la salud humana y bienestar. Hay tres principales AG omega-3 en la dieta: ALN (C_{18:3n-3}), EPA (C_{20:5n-3}) y DHA (C_{22:6n-3}). Los AG de mayor importancia a nivel funcional parecen ser el EPA y el DHA (Calder y Yaqoob, 2009), aunque también existe evidencia que demuestra que el ácido docosapentaenoico (**DPA**, C_{22:5n-3}) puede cumplir algún rol preponderante en la salud (Kaur *et al.*, 2011). Debido al largo tamaño de la cadena hidrocarbonada EPA, DPA y DHA se denominan AG omega-3 de cadena larga.

El consumo de AGPI omega-3 de cadena larga está vinculado con efectos protectores de la salud humana, a través de la modificación favorable de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Los siguientes factores se pueden reducir con estos AGPI omega-3: la presión arterial (Geleijnse *et al.*, 2002), la reactividad plaquetaria y la trombosis (British Nutrition Foundation, 1992, citado por Calder *et al.*, 2009), las concentraciones de triglicéridos en plasma (Harris, 1996), arritmias cardíacas (von Schacky, 2008), y la inflamación (Calder, 2006). Por lo tanto, un perfil más saludable del factor de riesgo daría como resultado una reducción de la acumulación de depósitos grasos (placas ateroscleróticas) dentro de la pared de los vasos sanguíneos, disminuyendo así el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

Algunos estudios han demostrado que el EPA y DHA ejercen funciones biológicas que podrían influir en la proliferación y viabilidad de células tumorales. Por ejemplo, el DHA puede promover la apoptosis de células tumorales (Gleissman *et al.*, 2010; Merendino *et al.*, 2013; Vaughan *et al.*, 2013), posiblemente a través de la inducción de estrés oxidativo.

Al mismo tiempo, el EPA y DHA también reemplazan al ácido araquidónico en las membranas celulares, resultando en una menor producción de mediadores como la prostaglandina E2 que impulsan la proliferación de células tumorales y el crecimiento tumoral (Gleissman *et al.*, 2010; Merendino *et al.*, 2013; Vaughan *et al.*, 2013). Las acciones antiinflamatorias de los AGPI omega-3 también pueden ser importantes para prevenir o retardar algunos pasos en la iniciación tumoral particularmente en algunos cánceres, por ejemplo, el cáncer colorrectal (Calder, 2014).

Una revisión sistemática reciente concluyó que los AGPI omega-3 son protectores contra el cáncer de mama. De la misma manera, se ha encontrado que en mujeres posmenopáusicas, un mayor consumo de EPA o DHA en la dieta se asoció con menor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Makarem *et al.*, 2013).

Otros beneficios de los AGPI omega-3 que promueven la salud incluyen sus efectos sobre el sistema inmunológico y su componente inflamatorio que se manifiesta en muchas enfermedades crónicas (Simopoulos, 2006; Calder, 2013). Por ejemplo, un aumento de la ingesta de EPA y DHA conduce a una reducción en la producción de citoquinas inflamatorias y pueden actuar como una terapia en enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide (Miles y Calder, 2012), enfermedades inflamatorias intestinales, asma, psoriasis y dermatitis atópica (Calder *et al.*, 2009 ; Calder *et al.*, 2013). Además, se reconoce que la inflamación crónica de bajo grado es un factor que contribuye a las enfermedades cardiovasculares (Hamazaki *et al.*, 2003; Hansson y Hermansson, 2011) y que desempeña un papel en enfermedades cardio-metabólicas como la obesidad, la diabetes tipo 2 y la enfermedad hepática grasa no alcohólica (Calder *et al.*, 2011).

Por otro lado, el DHA es importante para la neurotransmisión y la estabilidad de la membrana neuronal (Lauritzen, 2001; Parletta *et al.*, 2013). Por lo tanto, el DHA parece esencial para un óptimo desarrollo visual, neural en niños, especialmente durante el

período fetal y temprano del infante cuando la retina y el sistema nervioso central se están desarrollando (Dunstan *et al.*, 2007; Calder, 2014). Otros estudios han resaltado el potencial de los AG omega-3 de cadena larga para contribuir al mejoramiento de la atención, aprendizaje infantil y desorden de comportamiento (Meguid *et al.*, 2008; Perera *et al.*, 2012), depresión (Su *et al.*, 2003) y reducir la carga de las enfermedades psiquiátricas en los adultos aunque estas posibles áreas de acción requieren un apoyo científico más sólido (Freeman *et al.*, 2006).

Los principales AGPI en las dietas occidentales son el AL ($C_{18:2n-6}$), que, por lo general, tiene un consumo 5 a 20 veces mayor que el ALN ($C_{18:3n-3}$) (Burdge y Calder, 2006). En la actualidad, existe un cambio relativo en el aporte de AG omega-6/omega-3 en los alimentos, que debido al cambio en los hábitos alimenticios hace que la relación omega-6/omega-3 sea 15-30:1, cuando la proporción ideal recomendada debería ser inferior a 5:1 (Webb *et al.*, 2005; Simopoulos, 2006). La leche tiene una composición beneficiosa en términos de relación omega-6/omega-3 en comparación con otros alimentos no derivados del mar, y puede ser tan baja como 2:1 si las vacas están consumiendo dietas con alta concentración de forraje fresco (Haug *et al.*, 2007).

2.1.4 Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

El ácido linoleico conjugado (CLA, por sus siglas en inglés) incluye una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12 octadecadienoico). Se encuentra de forma natural en los alimentos derivados de rumiantes como la carne, leche y productos lácteos debido al proceso de biohidrogenación bacteriana que utiliza C_{18:2} o C_{18:3} como precursores (Bhattacharya *et al.*, 2006).

Existe un interés especial sobre la concentración de los CLA ya que investigaciones en modelos animales han demostrado una gran variedad de efectos benéficos de estos AG sobre la salud humana incluyendo propiedades antiaterogénicas y antiproliferativas (Bauman *et al.*, 2001), propiedades anticancerígenas (Kelley *et al.*, 2007), adipogénicas (Park *et al.*, 1999; Pariza *et al.*, 2001), antidiabéticas (Ryder *et al.*, 2001) y antiinflamatorias (Yang y Cook, 2016), reducción del desarrollo de la aterosclerosis (Serra *et al.*, 2009), estimulación de la función inmune (Bhattacharya *et al.*, 2006) y disminución de la glucemia (Belury, 2002).

La forma biológicamente activa de los CLA estaría representada por el isómero *cis*-9, *trans*-11 CLA (ácido ruménico) que representa entre el 75 al 85% del total de CLA en leche (Bauman *et al.*, 2001; Funck *et al.*, 2006). Los CLA representan compuestos intermedios en la hidrogenación ruminal del AL (C_{18:2n-6}) a ácido esteárico (C_{18:0}). El ácido *trans*-11 C_{18:1} (AV) resulta un intermediario común en la biohidrogenación del AL (C_{18:2n-6}) y del ALN (C_{18:3n-3}). La reducción ruminal del AV a esteárico resulta incompleta y conduce a una acumulación del compuesto. La síntesis endógena de AR en glándula mamaria a partir del AV por efecto de la enzima delta-9 desaturasa, sería la principal vía de acumulación de AR en leche bovina, explicando aproximadamente un 70% de la síntesis del compuesto (Bauman y Griinari, 2001). Una proporción variable de AGPI, desde 2 hasta 20%, es recuperada en la leche como AV. Hay una fuerte relación entre las concentraciones de AR y AV en la leche, siendo la concentración de AV 2 a 2,5 veces superior que la de AR (Elgersma *et al.*, 2006). Dado que el AV puede ser convertido a AR en los tejidos humanos (Salminen *et al.*, 1998) el consumo de AV puede conferir beneficios similares al consumo directo de AR sobre la salud humana.

Muchos estudios han demostrado efectos beneficiosos del *cis*-9, *trans*-11 CLA en modelos animales (Parodi, 1999). En seres humanos, hay evidencia que el *trans*-11, *cis*-12 CLA y *cis*-9, *trans*-11 CLA tienen efectos beneficiosos sobre diferentes tipos de cáncer (Martin y Valeille, 2002). Existe evidencia que indica que el CLA inhibe la iniciación y la incidencia de tumores mamarios en roedores (Koba y Yanagita, 2014), y que tuvo efectos anti-obesos e hipolipidémicos en animales (Pariza *et al.*, 2001). Posiblemente, los resultados más controversiales en términos de efectos del CLA sobre la salud humana están relacionados con sus propiedades putativas anti-obesidad (Brown y McIntosh, 2003; Racine *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). Los efectos anti-obesidad e hipolipidémicos del CLA se han atribuido a los isómeros *trans*-10, *cis*-12 CLA en lugar del *cis*-9, *trans*-11 CLA (Nagao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). Por otro lado, algunos estudios demostraron que el *cis*-9, *trans*-11 CLA puede aumentar los niveles de las lipoproteínas de alta densidad (**HDL**) y mejorar la relación HDL/LDL. Por el contrario, en otro estudio, *cis*-9, *trans*-11 CLA no mostró ningún cambio en el colesterol LDL ni HDL (Martin y Valeille, 2002).

Se considera que el CLA es un constituyente importante de las ceramidas, especialmente aquellas que se encuentran en la piel (Rabionet *et al.*, 2014). Por lo tanto, la deficiencia de AG esenciales da como resultado la ruptura de la integridad de la piel y la incapacidad para prevenir la pérdida de agua transdérmica (Calder, 2015).

También existe evidencia de que el CLA puede normalizar el metabolismo de la glucosa. Se sugirió que los efectos antidiabéticos y antiadipogénicos del CLA en animales y en humanos se deben a la acción específica del *trans*-10, *cis*-12 CLA (Koba y Yanagita, 2014). Sin embargo, también hay evidencia creciente de que el CLA puede generar otros efectos indeseables como la resistencia a la insulina, disminuir la sensibilidad a la insulina creando un estado pre-diabético en personas con sobrepeso sin diabetes (Riserus *et al.*, 2002; 2004; Moloney *et al.*, 2004). Se observó resistencia a la insulina en personas en los que se suplementó solo el *trans*-10, *cis*-12 CLA, pero esto no se observó cuando los suplementos contenían una mezcla de otros isómeros de CLA (Martin y Valeille, 2002). Es necesario más trabajo de investigación en este campo para elucidar el rol que tienen los diferentes isómeros de CLA sobre el metabolismo lipídico en los tejidos.

2.2 Metabolismo ruminal de los lípidos

Las dietas de los rumiantes generalmente son bajas en contenido de grasa, conteniendo aproximadamente 2 – 5% de lípidos. Los lípidos son una parte importante de la ración de vacas lecheras porque contribuyen directamente al 50% de la grasa en la leche y son la fuente de energía más concentrada en los alimentos balanceados. Los AG predominantes son el ALN ($C_{18:3n-3}$) y el AL ($C_{18:2n-6}$), presentes comúnmente en cultivos de cereales, oleaginosas y pastos (Tabla 2.2). Los lípidos cuantitativamente más importantes en la alimentación de los rumiantes son aquellos que contienen AG unidos a glicerol: triglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos. Los AG en los forrajes se componen principalmente de galactolípidos, los granos de cereales contienen mayoritariamente glicolípidos y fosfolípidos y en las semillas oleaginosas (por ejemplo, soja, girasol, canola, entre otros) predominan los triglicéridos. Los lípidos al ser ingeridos, son sometidos a un intenso metabolismo ruminal para luego ser digeridos y absorbidos a nivel intestinal.

El metabolismo de lípidos en animales monogástricos difiere totalmente al de los rumiantes. En los monogástricos, la digestión y absorción de los lípidos ocurre a partir del intestino delgado y solo algunos cambios despreciables pueden ocurrir en la parte anterior al mismo. Por el contrario, en los rumiantes, los alimentos ingresan primero al retículo-rumen que actúa como una cuba de fermentación. Bacterias, protozoos y hongos fermentan los alimentos en el rumen, liberando productos finales que son utilizados por el animal para el mantenimiento y crecimiento de los tejidos corporales. Esta población microbiana en el rumen también es responsable de la transformación extensa del lípido dietario (Jenkins, 2004).

Del mismo modo, el metabolismo extenso de los lípidos tiene un impacto importante en el perfil de los AG disponibles para la absorción y la utilización por parte de los tejidos, resultando en una marcada diferencia entre el perfil de AG de la dieta, que en su mayoría es insaturado y el que abandona el rumen, el cual es saturado en su mayoría (Jenkins *et al.*, 2007). Los primeros estudios realizados por Harfoot, (1978) y Palmquist y Jenkins (1980) sobre el metabolismo ruminal de los lípidos, identifican dos procesos principales de transformación microbiana en rumen: lipólisis (hidrólisis de los enlaces de éster) y la biohidrogenación (saturación de dobles enlaces). Las tasas de lipólisis y de biohidrogenación pueden estar influenciadas por diversos factores como lo son: el estado de madurez del forraje, el contenido en nitrógeno, el tamaño de las partículas en el rumen (Jenkins, 1993), tipo y cantidad de grasa suministrada al rumen (Beam *et al.*, 2000) y el pH ruminal (Van Nevel y Demeyer, 1996).

Tabla 2.2 Composición y perfil de AG (% del total de AG) de los productos y suplementos grasos utilizados en la nutrición de rumiantes.

Alimentos*	C _{14:} 0	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:} 0	C _{18:} 1	C _{18:2}	C _{18:} 3	Otros*
AG, % del total de AG								
Pasturas								
Gramíneas	0,5	19,2	0,2	1,6	2,2	20,4	55,9	-
Trébol	0,5	22,9	0,3	3,4	3,6	21,1	48,2	-
Gram. + legum.	1,5	20,0	1,2	2,6	4,2	18,9	51,6	-
Ensilado								
Gramíneas	5,4	24,0	0,6	2,9	6,3	14,5	46,2	-
Maíz	1,1	15,2	0,5	3,5	18,9	40,9	6,1	13,8
Heno de alfalfa	1,2	22,9	0,4	4,0	4,9	18,1	23,5	25,0
Granos								
Cebada	0	27,6	0,9	1,5	20,5	43,3	4,3	1,9
Maíz	0	16,3	0	2,6	30,9	47,8	2,3	-
Avena	0	22,1	1,0	1,3	38,1	34,9	2,1	0,5
Trigo	0	20,0	0,7	1,3	17,5	55,8	4,5	0,2
Subproductos								
Gluten meal	0	17,2	0,9	0,8	26,7	53,0	1,4	0
Granos de destilería	0	15,6	0	2,7	24,2	54,5	1,8	1,2
Semillas oleaginosas								
Soja ext.	0	14,5	0	3,8	19,5	53,2	9,1	0
Algodón ext.	0	23,4	0,5	2,2	16,5	57,4	0	0
Semilla lino	0	6,5	0	4,0	22,7	15,4	51,4	0
Aceite pescado	8,0	22,0	11,0	3,0	21,0	2,0	1,0	32,0
Grasa animal	3,2	24,8	5,3	14,5	45,9	5,9	0,3	0

*Gram: gramíneas; legum.: leguminosas, ext.: extrusionada; **Otros AG presentes en el aceite de pescado incluye el C_{20:5} (14%), C_{22:6} (10%), y otros AGPI (8%). Fuente: Adaptado de Dhiman *et al.*, (2005)

2.2.1 Lipólisis

El paso inicial en el metabolismo ruminal de los lípidos es la hidrólisis de los enlaces éster encontrados en los triglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos. Las acciones lipolíticas de las bacterias ruminales a través de enzimas lipasas causan la liberación de los AG libres de los lípidos esterificados (Figura 2.6). La lipólisis libera los AG y el glicerol, o galactosa en el caso de los glicolípidos, con escasa acumulación de mono o diglicéridos (Hawke y Silcock, 1970). La galactosa y el glicerol son rápidamente fermentados produciendo AG volátiles (AGV), como el ácido acético y ácido propiónico respectivamente. El grado de

hidrólisis es generalmente alto (> 85%), y se han identificado varios factores que afectan la tasa y el grado de hidrólisis (Bauman *et al.*, 2006).

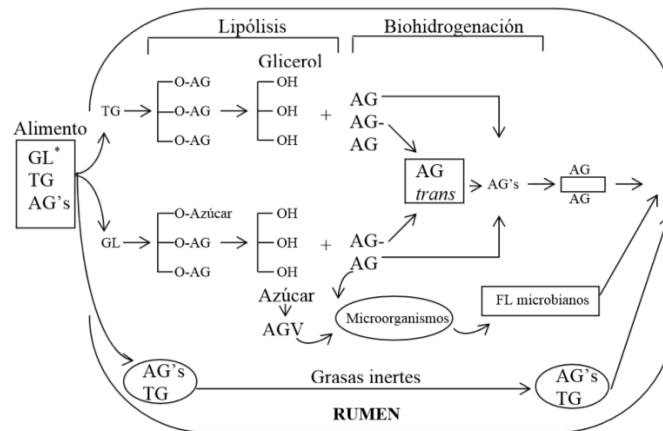


Figura 2.6 Esquema del metabolismo de los lípidos en el rumen: lipólisis y biohidrogenación. Fuente: Fuentes, (2009)

Abreviaciones: GL: glucolípidos; TG: triglicéridos; AG's: mezcla de ácidos grasos; AG- : ácidos grasos insaturados; FL: fosfolípidos; AGV: ácidos grasos volátiles; AG: ácidos grasos unidos a las partículas de alimento.

La hidrólisis de los lípidos dietarios se debe principalmente a las bacterias ruminales, con poca evidencia de un rol significativo por los protozoos y hongos del rumen, o lipasas salivares y vegetales (Lock *et al.*, 2006). Los microbios tienen una alta capacidad de lipólisis y la velocidad de ese proceso depende principalmente de la disponibilidad de AG esterificados y de su liberación a partir de partículas de alimento (Jenkins y Harvatine, 2014). También, se ha demostrado que el pH ruminal bajo (pH 5,2) disminuye la lipólisis (Van Soest y Demeyer, 1996). De igual forma, la tasa de lipólisis se relaciona con el punto de fusión; por ejemplo, los aceites de semilla de lino y soja presentan mayor tasa que el aceite de palma, y la de ésta es igual a la del sebo. El aceite de pescado se hidroliza más lentamente, posiblemente por impedimento de los enlaces éster del ácido esteárico (Miller y Cramer, 1969; Palmquist y Kinsey, 1994, citados por Palmquist *et al.*, 2005).

2.2.2 Biohidrogenación ruminal

Siguiendo con las transformaciones que sufren los lípidos dietarios en el rumen, tiene lugar la biohidrogenación de los AG insaturados. Este proceso requiere de grupos carboxilo libres, por lo que la lipólisis aparece como un paso anterior obligatorio. Durante este proceso, las bacterias ruminales transforman los AG insaturados a través de enzimas microbianas, reduciendo los dobles enlaces de AG convirtiéndolos de insaturados a saturados (Bauman *et al.*, 2006). Por lo tanto, la proporción de AG insaturados que se puede absorber en el intestino delgado se puede alterar drásticamente por este proceso (Jenkins, 2004).

Los principales sustratos de la biohidrogenación ruminal son el ALN (C_{18:3n-3}) y el AL (C_{18:2n-6}), y en vacas lactantes éstos se hidrogenan en una proporción de 70 a 95% y 80 a 100%, respectivamente (Lock *et al.*, 2005; 2006). Las velocidades de biohidrogenación ruminal son típicamente más rápidas con el aumento de la insaturación de los AG (Bauman *et al.*, 2006). El paso inicial de la biohidrogenación ruminal del AL (C_{18:2n-6}) consiste en una reacción de isomerización que convierte el doble enlace *cis*-12 a una configuración *trans*-11, resultando proporciones variables de isómeros (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-9, *cis*-11; *trans*-10, *cis*-12, entre otros) de CLA, entre los que destaca el AR (*cis*-9, *trans*-11 C_{18:2}), que es el isómero en mayor proporción en la grasa láctea, y representa del 75 al 90% de los CLA totales (Bauman *et al.*, 2003). Seguidamente, se produce una reducción del doble enlace *cis*-9 resultando en un AG *trans*-11, resultando la formación de AV (*trans*-11 C_{18:1}). El paso final es una hidrogenación del doble enlace *trans*-11 para producir ácido estearico (C_{18:0}) (vías del ALN y AL) o *trans*-15 (vías del ALN). La biohidrogenación del ALN comienza igualmente con la isomerización del enlace *cis*-12 a *trans*-11, donde posteriormente se hidrogenan los enlaces *cis*-9 y *cis*-15 dando lugar al AV (Figura 2.7). Este proceso no incluye la formación de AR como intermediario, pero sí de otros isómeros de CLA.

Después de la isomerización, se producen sucesivas etapas de hidrogenación catalizadas por reductasas microbianas. El grado de biohidrogenación depende de las diferentes condiciones del rumen. Por ejemplo, la hidrogenación completa del ALN (C_{18:3n-3}) a C_{18:0} es inhibida por la acumulación ruminal de AL (C_{18:2n-6}) (Jenkins, 1993). El AV también inhibe la biohidrogenación del AL (C_{18:2n-6}) (Scollan *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2004).

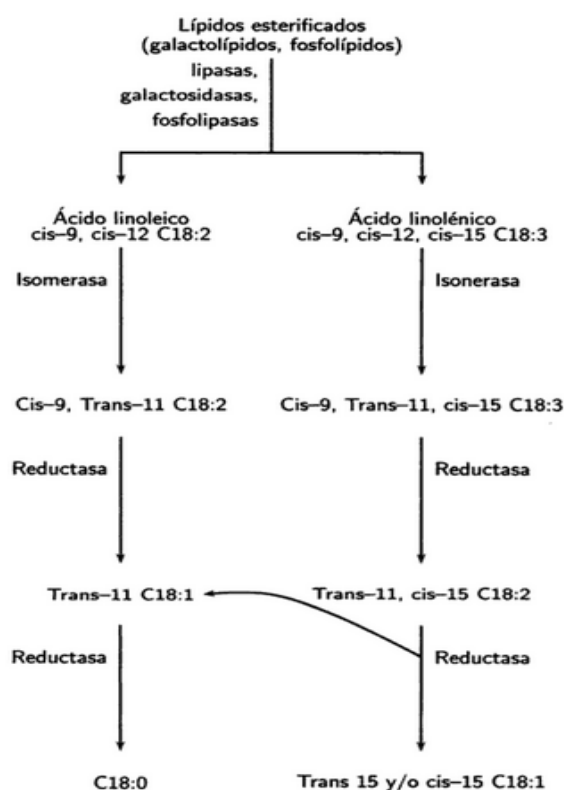


Figura 2.7 Pasos clave en la conversión de lípidos esterificados a ácidos grasos saturados por lipólisis y biohidrogenación ruminal. Fuente: Pabón Restrepo, (2004)

El metabolismo de AG en el rumen parece variar con la dieta basal y particularmente con la proporción forraje / concentrado. Por ejemplo, se ha informado que la alimentación de vacas lecheras con dietas con alta concentración de concentrados en comparación con las dietas con mayor participación de forraje, disminuye el grado de biohidrogenación de los AGPI en el rumen (Kalscheur *et al.*, 1997). Esta respuesta se ha asociado con un cambio en las poblaciones bacterianas (Benchaar *et al.*, 2014).

2.2.3 Síntesis de ácidos grasos bacterianos

Las bacterias ruminales tienen la capacidad de sintetizar o incorporar AG del medio a sus membranas celulares (Demeyer y Doreau, 1999). Las bacterias ruminales se caracterizan por tener una gran proporción de AGS en su composición, sobre todo estearico (C_{18:0}) y palmítico (C_{16:0}) (Bas *et al.*, 2003), que se originan a partir de fuentes exógenas (absorción de AG de cadena larga derivados de la dieta) y de fuentes endógenas (síntesis *de novo*). El contenido total de lípidos de la materia seca bacteriana en rumen oscila entre un 10 y un 15% y varía de acuerdo con el aporte lipídico de la dieta (Jenkins, 1993).

Los AG sintetizados *de novo* consisten principalmente en C_{18:0} y C_{16:0}. Además, en los AG bacterianos se pueden encontrar alrededor de un 15 a un 20% de AGMI (por ejemplo, *trans*-10 C_{18:1}, *trans*-11 C_{18:1}), así como también AGPI C₁₈ (por ejemplo, *cis*-9, *trans*-11 C_{18:2}; *trans*-10, *cis*-12 C_{18:2}; *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2}) derivados de la biohidrogenación de los ALN (C_{18:3n-3}) y AL (C_{18:2n-6}) de la dieta (Katz y Keeney, 1966).

2.2.4 Digestión y absorción de los ácidos grasos

Los AG que llegan al duodeno se encuentran mayoritariamente adsorbidos a las partículas alimenticias, a las bacterias y a las células endoteliales descamadas (Demeyer y Doreau, 1999). En los rumiantes, el 80-90% del material lipídico que entra en el intestino delgado se encuentra en forma de AG libres (no esterificados), en contraste con los no rumiantes, donde la mayoría es esterificado (> 90%) (Lock *et al.*, 2005). Los componentes lipídicos restantes son fosfolípidos microbianos y pequeñas cantidades de triglicéridos y glicolípidos del material residual de los alimentos, que son hidrolizados por lipasas intestinales y pancreáticas (Doreau y Ferlay, 1994).

Una vez absorbidos, una gran parte de los AG son esterificados a glicerol-3-fosfato para formar triacilgliceridos en las células del intestino delgado y ser transportados en la sangre como lipoproteínas (VLDL; lipoproteínas de muy baja densidad, LDL y HDL) (Roca-Fernández *et al.*, 2011). En contraste con la mayoría de los nutrientes absorbidos del tracto gastrointestinal, los lípidos absorbidos entran en la circulación general directamente y son utilizados por todos los tejidos del cuerpo sin un procesamiento preliminar por el hígado.

Algunos intermediarios de la biohidrogenación ruminal son transformados por los tejidos corporales, especialmente por la glándula mamaria donde actúa la enzima estearoil-CoA desaturasa (delta-9 desaturasa). La función de esta enzima es regular la fluidez lipídica de membranas celulares (Smith, 1995); lo cual es importante cuando las cambian las temperaturas y la membrana está en peligro. La enzima introduce dobles enlaces *cis*- entre los carbonos 9 y 10 de los AG (Silva *et al.*, 2009), lo que permite que la membrana se vuelva más fluida y la temperatura disminuya.

2.3 Factores que afectan la concentración de ácidos grasos en la leche

La calidad y composición de los AG de la leche pueden alterarse significativamente a través de estrategias nutricionales, ofreciendo la oportunidad de responder a las demandas del mercado con productos que benefician la salud humana (Lock y Bauman, 2004). A su vez, la concentración de AGPI en leche está influenciada por muchos factores relacionados con el animal y con el medio ambiente del animal. Algunos factores como la dieta (Ferlay *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2010), la raza (Soyeurt *et al.*, 2006; Palladino *et al.*, 2010), la genética del animal (Soyeurt *et al.*, 2008), el estado de lactancia (Craninx *et al.*, 2008), el manejo (Coppa *et al.*, 2013), la época estacional (Heck *et al.*, 2009), y las interacciones entre estos factores (Macdonald *et al.*, 2008), pueden afectar la composición de la leche. Como ejemplo de los factores que pueden influir en la composición de los AG de los productos derivados de rumiantes, se presenta un resumen de aquellos que afectan particularmente el contenido de CLA en leche y carne (Tabla 2.3).

Tabla 2.3 Factores asociados con las variaciones en la composición y concentración de CLA en leche y carne de rumiantes.

Factores	Efecto sobre el CLA
<i>A) Relacionados a la dieta</i>	
Pastura Fresca	Altamente positivo
Pastura + aceite de pescado	Positivo
Madurez de la pastura	Negativo
Alto contenido forraje en la dieta	Positivo
Alto contenido de grano en la dieta	Negativo
Semillas oleaginosas asadas	Positivo
Semillas oleaginosas extruidas	Positivo, mejor que las semillas asadas
Aceites vegetales	Positivo, mejor que las semillas procesadas
Aceite de pescado	Positivo, eficientes que los aceites vegetales
Sales de Ca de ácidos grasos	Positivo
PH del rumen	Positivo con pH > 6.0
Suplementos CLA	Positivo
Grasas trans	Positivo
Ionóforos	Probablemente positivo
Dietas de baja energía	Probablemente positivo
<i>B) Relacionados con animales</i>	
Especie	Rumiantes > no rumiantes
Raza	Holstein > Jersey
Paridas	Mínimo
Años	¿
Etapas de la lactancia	Mínimo
De animal a animal	Positivo con alta actividad de Delta-9 desaturasa

Fuente: Adaptado de Khanal y Olson, (2004)

2.3.1 Sistema de Alimentación

Está bien documentado que la dieta del animal afecta el contenido de grasa y la composición de AG de la leche (Bauman y Griinari, 2003; Bauman *et al.*, 2008). Las pasturas son ricas en ALN (C_{18:3n-3}), que representa el 48-56% del contenido total de AG. Es por ello, que en los sistemas de alimentación pastoril la leche de los animales contiene mayor proporción de AG omega-3 y AR en comparación con la leche de animales alimentados con granos y concentrados (Kay *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2009; Vanhatalo *et al.*, 2007). En otros estudios se informó que la concentración de AR en la grasa de la leche de vacas en pastoreo duplicó a la de vacas alimentadas con dietas TMR, basadas en forrajes conservados y concentrados (Kelly *et al.*, 1998; White *et al.*, 2001).

Los estudios de ganado lechero han confirmado que una dieta basada exclusivamente en forrajes verdes o en dietas TMR, comparada con una dieta basada en concentrado, reduce la presencia de AG aterogénicos (láurico, mirístico y palmítico) e incrementa la cantidad de CLA y AGPI omega-3 en la grasa de la leche (Dewhurst *et al.*, 2006). Generalmente, las TMR están compuestas por forrajes conservados (heno de alfalfa, heno de pasto y ensilado, ensilado de maíz, ensilaje de cereales integrales, entre otros) y concentrados que son más bajos en contenido de AL (C_{18:2n-6}) que el forraje fresco (Schroeder *et al.*, 2004a; Dewhurst *et al.*, 2006).

El ensilaje de maíz es rico en AL (C_{18:2n-6}) y el heno de alfalfa en ALN (C_{18:3n-3}); sin embargo, una parte significativa de los AG insaturados se oxida durante el proceso de secado. Como resultado, los animales en pastoreo producen leche con mayores concentraciones de CLA en comparación con los animales con dietas ricas en ensilaje, heno y concentrados (Dannenberger *et al.*, 2005). Schroeder *et al.* (2004) indicaron que se registraron incrementos en la concentración de CLA entre el 15% y el 396% en vacas en pastoreo en comparación con vacas alimentadas con dietas TMR. Dhiman *et al.* (2005) informaron que las vacas en pastoreo presentaron concentraciones de CLA 500% mayores en leche en comparación con las vacas alimentadas con dietas que contenían 50% de concentrado y 50% de forraje conservado. De la misma manera, Kelly *et al.* (1998) concluyeron que las vacas en pastoreo tenían el doble de la concentración de CLA y cuatro veces más ALN (C_{18:3n-3}) en la leche que las vacas alimentadas con dietas TMR.

En resumen, hay suficiente evidencia para demostrar el aumento en la concentración de CLA y omega-3 en los AG de la leche en sistemas pastoriles respecto de alimentaciones con mayor uso de concentrados, sin embargo, hay varios factores relacionados con el manejo de las pasturas, la especie, la época, entre otros, que afectan el contenido de AGPI de la leche (Dewhurst *et al.*, 2006).

2.3.2 Suplementación en la dieta con fuentes lipídicas

Varios estudios han demostrado que es posible aumentar la concentración tanto de los AGPI, omega-3 y CLA en la leche por medio de la suplementación estratégica en la dieta base (Petit *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2004; Kliem y Shingfield, 2016). Sustituir el forraje y los ingredientes del concentrado con aceites vegetales, semillas oleaginosas o suplementos lipídicos resistentes al metabolismo ruminal es la forma más efectiva para disminuir las concentraciones de AGS de la grasa de la leche y aumentar los AGPI en leche (Chilliard *et al.*, 2007; Glasser *et al.*, 2008; Givens *et al.*, 2006). La medida en que los aceites vegetales o las semillas oleaginosas alteran la composición de los AG de la leche depende de varios factores: por ejemplo, la dosis de lípidos en la dieta, la composición de AG del suplemento lipídico, forma de alimentación de lípidos (grado de

procesamiento y que sean inertes en el rumen) y la composición de la dieta basal (Kliem y Shingfield, 2016). Las respuestas a la suplementación de grasas son muy variables, incluso dentro de cada tipo de grasa (Rabiee *et al.*, 2012). El perfil de los AG de los suplementos lipídicos disponibles difiere según el nivel de insaturación y la longitud de cadena de los AGS. Generalmente, se espera que los suplementos altos en AGS tengan efectos mínimos sobre la fermentación ruminal en comparación con suplementos altos en AGPI (Jenkins, 1993).

Un meta-análisis basado en datos obtenidos de 106 experimentos en vacas lactantes proporcionó una evaluación cuantitativa completa de los cambios en la composición de la grasa láctea en respuesta a semillas oleaginosas intactas o procesadas, aceites vegetales, protegidas ruminalmente (amidas, formaldehído y aceites encapsulados) e inertes al rumen (AG-Ca) incluidas en dietas que contienen una gama de forrajes e ingredientes concentrados (Glasser *et al.*, 2008). Los suplementos lipídicos no tuvieron efecto sobre la concentración de C_{4:0} de la leche, excepto una disminución lineal cuando se utilizó semilla de lino (C_{4:0}; g/100 g de AG = 0,65 - 0,34 x kg de aceite/d; $n = 20$; $R^2 = 0,23$; $P < 0,05$). Las proporciones de AG de leche de C_{6:0}-C_{8:0} disminuyeron linealmente con el uso de suplementos a base de semilla de colza, soja y girasol (medias de -0,85, -1,05, -0,93 g/100 g AG por kg de aceite/d), con algunas indicaciones de disminuciones mayores con el aceite de lino que con las semillas de lino (medias de -2,12 y -0,74 g/100 g AG por kg de aceite/d, respectivamente). Las proporciones de C_{10:0}-C_{14:0} se redujeron de forma lineal (respuestas medias de 4,5 a 5,8 g/100 g de AG suministrando una dosis de 600 g de aceite/d) sin diferencia en la eficacia entre las fuentes de lípidos, con excepción de una disminución mayor para el aceite de lino respecto de las semillas de lino. Por otro lado, hubo disminución en los AGS de cadena corta y media que fue acompañada por aumentos lineales o cuadráticos en las concentraciones de C_{18:0} en la grasa de la leche, con excepción del aceite de girasol. El aumento en las proporciones de C_{18:0} varió entre +3,6 a +5,6 g/100 g de AG suministrando una dosis de 600 g de aceite/d.

Otros estudios demuestran que la suplementación con grasa de soja a vacas lecheras en pastoreo o semillas de colza aumentaron la concentración de CLA en la leche (Lawless *et al.*, 1998). De la misma manera, se han reportado incrementos en C_{18:0}, ácido oleico, AL y ALN cuando las vacas fueron suplementadas con soja (Murphy *et al.*, 1995). Sin embargo, la respuesta a la suplementación es inconsistente debido a que el CLA es un producto de la biohidrogenación de los precursores en el rumen. Contrariamente, Petit *et al.* (2002) no observaron incrementos en CLA u omega-3 cuando las vacas fueron suplementadas con semillas enteras de lino tratadas con formaldehído o semillas enteras de lino tratadas con formaldehído más aceite de pescado, como consecuencia del bajo grado de biohidrogenación de los AGPI constitutivos en el rumen, lo que demuestra que la biohidrogenación es un paso limitante para incrementar sustancialmente el contenido de CLA o de omega-3 en la leche.

Por otra parte, en algunos estudios individuales se ha demostrado que las semillas oleaginosas enteras tienen poco efecto (Chilliard *et al.*, 2009) o ninguno (Givens *et al.*, 2009) sobre la concentración de AGS de la grasa de la leche, en comparación con los cambios en las semillas oleaginosas procesadas o los aceites vegetales. Los cambios en las concentraciones de los AG C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0} en leche, por medio de la suplementación con aceite de pescado y algas marinas, resultan ser mucho más pequeños en comparación con los aceites vegetales y las oleaginosas.

2.3.3 Fuentes de lípidos protegidos

Para clasificar los suplementos lipídicos en las raciones para rumiantes, se consideran los siguientes aspectos: en qué grado la grasa resiste a la biohidrogenación y a la fermentación ruminal y cómo afecta la fuente de grasa la digestión de los demás nutrientes de la ración. De acuerdo a estas pautas las grasas se pueden clasificar como inertes a nivel ruminal y reactivas a nivel ruminal (Jenkins, 2004). El grado de protección ruminal de los lípidos debe ser alto para minimizar su impacto negativo sobre la actividad metabólica microbiana (Ashes *et al.*, 1997). Proteger los lípidos de la hidrogenación ruminal puede conducir a un cambio en el perfil de AG de la leche, pero esto depende del grado de protección. Esta protección puede ser natural (semillas enteras) o artificial (AG-Ca, AG encapsulado, entre otros).

La alimentación del ganado con cierta cantidad de semillas oleaginosas conteniendo lípidos protegidos por la cobertura de las semillas, es la manera más simple y económica de proteger los AGPI de la biohidrogenación ruminal y prevenir su impacto negativo en la actividad de los microorganismos ruminales (Ward *et al.*, 2002). En los últimos años se han publicado diversos estudios que demuestran que la producción de AG-Ca, es la protección química más utilizada y eficaz de los AG insaturados para alimentar al ganado (McNamara *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2008; Côrtes *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2010; Rennó *et al.*, 2014). Las AG-Ca de los AGPI permanecen constantes en condiciones de pH ruminal, prácticamente no se someten a la hidrogenación por los microorganismos en el tracto digestivo, y mientras se transfieren al intestino delgado, se liberan de los iones de calcio y los AGPI son así absorbidos por la membrana mucosa del intestino delgado y transportados por la sangre a los órganos y los tejidos (Stevens, 1990).

La utilización de AG-Ca elaboradas a base de aceites vegetales en las dietas de vacas lecheras mejora la producción, la proporción de grasa y lactosa en la leche (Fahey *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2013), mientras que la proporción de proteínas se ve disminuida; sin embargo, la producción general no cae (Wu y Huber, 1994). Además, permite disminuir la proporción de AGS y aumentar el nivel AGPI, incluido el ALN (C_{18:3n-3}) en la grasa de la leche (Côrtes *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2010; Rennó *et al.*, 2013).

Se sabe que las concentraciones de *cis*-12 a -16 18:1 en la leche, AG que se originan en el rumen debido a la biohidrogenación incompleta del AL (C_{18:2n-6}) y ALN (C_{18:3n-3}) a C_{18:0} (Jouany *et al.*, 2007), se incrementan con la adición de semillas de girasol y semillas de lino molidas (Collomb *et al.*, 2004), semilla de lino extruidas (Lerch *et al.*, 2012) y aceite de lino (Chilliard *et al.*, 2009).

2.3.3.1 Efectos de la suplementación con lípidos protegidos sobre el consumo de materia seca (MS)

Los resultados de varios estudios experimentales demuestran que el aumento del nivel de lípidos y AG en la dieta inhibe los procesos de fermentación en el rumen, disminuyendo la digestión de la materia orgánica del forraje (Martin *et al.*, 2008; Beauchemin *et al.*, 2009). Uno de los efectos secundarios más conocidos de la suplementación con lípidos protegidos es la depresión en la concentración de grasa y/o proteína en la leche debido a las reducciones asociadas al consumo de materia seca (MS) total de la dieta y a la digestión de la fibra en el rumen (Schroeder *et al.*, 2004), lo que puede reducir en gran medida o incluso eliminar una respuesta positiva a la producción.

Se han reportado reducciones en el consumo de MS para una gran variedad de fuentes de lípidos y a menudo, las depresiones en el consumo son menos severas para las grasas animales que para los aceites vegetales o ciertos suplementos de grasa comerciales (Jenkins, 2016). A su vez, la depresión del consumo de MS es mayor cuando los suplementos de la grasa contienen altos niveles de AG insaturados que cuando son altos en AGS (Jenkins, 2016).

Existen varios factores que pueden causar la depresión del consumo de MS por los AG insaturados, tales como mayores concentraciones de AG no esterificados (AGNE) en sangre (Palmquist, 1994), la reducción de la motilidad intestinal, reducción de la aceptabilidad de las dietas con la adición de lípidos (Allen, 2000), o la liberación de hormonas intestinales y oxidación hepática de los AG (Onetti y Grummer, 2004; Relling y Reynolds, 2007). Las hormonas intestinales siguen recibiendo una atención considerable como reguladores del consumo de MS. La secreción intestinal de colecistoquinina (CCK) es activada por la presencia de lípidos (Choi y Palmquist, 1996) y se ha demostrado que esta hormona tiene un efecto inhibitorio sobre el consumo.

En relación a la protección del lípido utilizado, está aceptado que las AG-Ca no afectan la digestibilidad de la fibra, debido a que son inertes en el rumen. La ausencia de efectos negativos de las AG-Ca en la digestión, se deben a los efectos específicos de los iones cálcicos (Doreau y Ferlay, 1994), lo que sugiere una adecuada protección (ausencia de disociación) de las AG-Ca. No obstante, Sukhija y Palmquist (1990) en un estudio realizado *in vitro*, reportaron que el AG-Ca proveniente de AG insaturados se disocian más fácilmente en el rumen en comparación con el AG-Ca proveniente de AGMI, lo que supondría una protección incompleta y la posible hidrogenación parcial de los AG protegidos. Rabiee *et al.* (2012) reportaron mayores disminuciones en el consumo de MS cuando se suministraron las semillas oleaginosas y AG-Ca de AG insaturados respecto de los AG o sebo. Sin embargo, en un resumen de más de 20 estudios lecheros donde alimentaron sebo o grasa, sólo dos estudios mostraron depresiones significativas en el consumo de MS (Allen, 2000).

2.4 Impacto de la suplementación con lípidos protegidos sobre parámetros productivos

Algunos estudios previos demuestran que la suplementación con lípidos aumenta la producción de leche en sistemas confinados (Gagliostro y Chilliard, 1992; Chilliard, 1993), teniendo un alta variabilidad en el nivel de respuesta. Contrario a esto, autores señalan que la producción de leche no siempre responde positivamente a la suplementación con lípidos (Moore *et al.*, 2005; Rego *et al.*, 2005). Las respuestas en producción de leche a la suplementación con lípidos son muy variables dependiendo del tipo de grasa utilizada y puede estar influenciada por distintos factores: por ejemplo, dieta basal, etapa de lactancia, nivel de producción, balance energético, efecto de los lípidos sobre el consumo de MS, composición de los lípidos y cantidad de lípidos suplementados (NRC, 2001).

En un estudio realizado por Reis *et al.* (2012) informaron que se logró mejorar la producción de leche mediante la suplementación de AG-Ca (específicamente AGPI, 1.1% base MS) en vacas lecheras respecto a las que no recibieron suplementación con AG-Ca. En otros estudios, Wina *et al.* (2015) encontraron que en vacas lecheras alimentadas con AG-Ca (2,5% del total de la dieta), la producción media de leche durante 4 meses fue mayor respecto al grupo control que no recibieron suplementación con AG-Ca, (11,41 y 10,74 kg/vaca.día, respectivamente). De la misma manera, Shibata *et al.* (2011) reportaron también un aumento del 7,41% en la producción de leche de vacas cuando suplementaron con 400 g de aceite de colza protegido respecto a los animales que no recibieron suplementación lipídica. Finalmente, se concluyó en un meta-análisis realizado por Rabiee *et al.* (2012) que la suplementación con AG-Ca o grasa enriquecida aumenta la producción de leche en vacas lecheras respecto a las vacas que no se suplementaron con algún tipo de grasa.

Por otra parte, al considerar en un amplio espectro tanto a la metodología de protección como a la cantidad de lípidos suplementados, en un meta-análisis realizado por Onetti y Grummer, (2004), con 21 experimentos involucrados promediaron un incremento en la producción lechera de 1,29 kg de leche por día ($P < 0,02$) cuando los animales fueron suplementados con 3,8% de MS de AG-Ca. Asimismo, en dicho meta-análisis, se estimó que en lactancia temprana (vacas con menos de 120 días en producción) por cada unidad en la que incrementa el contenido de lípidos protegidos de la ración, la producción de leche aumenta 0,3 kg/vaca.día; sin embargo, no se detectaron efectos significativos en vacas de lactancia tardía. No obstante, otros autores (Salado, 2000; Schingoethe y Casper, 1991) observaron que si la suplementación con lípidos protegidos empieza poco después del post-parto, puede pasar un período de tiempo antes de que haya una respuesta en producción de leche.

En su revisión, Schroeder *et al.* (2004) recopilaron 18 estudios donde suministrando diferentes suplementos a base de grasa a vacas en pastoreo se observó que tanto los suplementos de grasas saturadas protegidas como los suplementos insaturados protegidos, aumentaron la producción de leche en un 5% promedio (0,97 kg/vaca.día). También considera que existe mayor respuesta en la producción de leche cuando se utilizan suplementos de grasas saturadas protegidas en comparación con las grasas insaturadas, y el mismo efecto se observa para vacas de lactancia media en comparación con vacas de lactancia temprana. En una revisión realizada por Gagliostro y Chilliard (1992), se registró un 15% de respuestas favorables al suplementar vacas lecheras con AG insaturados protegidos respecto a grasas saturadas protegidas.

Estos aumentos en la producción de leche suplementando con grasas saturadas protegidas y con AG-Ca, pueden estar relacionados con una mejora en la utilización de la energía, debido a que los AG de la dieta son incorporados directamente en la grasa láctea por la glándula mamaria. Esto podría explicarse por una mayor disponibilidad de glucosa a nivel de glándula mamaria (por ende, una mayor síntesis de lactosa) debido a un ahorro de glucosa, por ser ésta reemplazada como fuente de energía para el organismo por los AG de cadena larga aportados por los lípidos protegidos (Enjalbert, 1995).

Por otra parte, hay un patrón en el comportamiento del rendimiento de la leche, el cual no necesariamente aumenta a medida que se adicionan los lípidos. A veces incluso puede ocurrir que la producción disminuya al añadir lípidos en la ración (Jenkins, 1998) (Figura 2.8):

- Fase I: en primera instancia, la producción de leche aumenta debido a una mayor densidad energética de la ración.
- Fase II: la producción de leche permanece estable a pesar del aumento en la concentración de lípidos en la dieta debido a que la energía adicional es contrarrestada por los efectos negativos del suplemento lipídico (menor digestibilidad de la dieta, reducción del consumo de alimento, baja digestibilidad de los lípidos, y posiblemente efectos metabólicos negativos).
- Fase III: predominan los efectos negativos y la producción de leche se reduce al incrementar la concentración del suplemento lipídico.

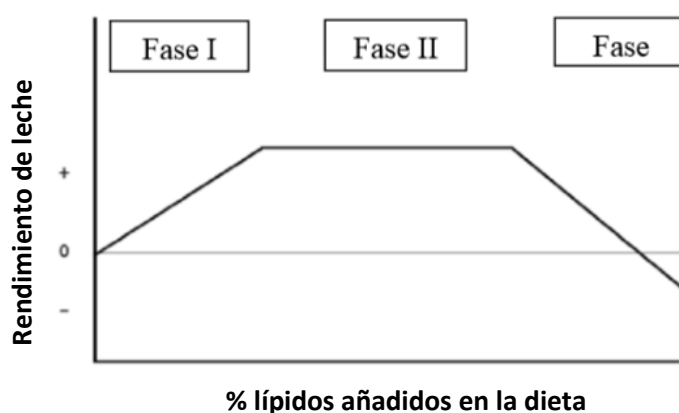


Figura 2.8 Modelo teórico que describe los cambios en la producción de leche al incrementar el porcentaje de lípidos en la dieta de vacas lecheras en lactancia. Comparado a una dieta control, la adición de lípidos puede causar aumento en la producción (+), disminución (-), o ningún cambio (línea plana). Fuente: adaptado de (Jenkins, 1998)

Según Jenkins (1998), todas las fuentes de lípidos se ajustan a este modelo, pero pueden diferir en el grado de respuesta que presenten en cada fase y en la cantidad de lípidos correspondientes. El incremento máximo de la leche por la adición de lípidos se produce en el punto donde la fase I y la fase II se encuentran. No obstante, la adición de lípidos por encima de este nivel no es rentable ya que no va acompañada de un aumento

adicional en la producción de leche. A su vez, los lípidos insaturados tienden a tener una fase I y II menor en comparación con los lípidos saturados en la misma proporción a las dietas.

2.4.1. Utilización de fuentes provenientes de la semilla de lino en vacas lecheras

La semilla de lino, también conocida como linaza, es una semilla obtenida de la planta de lino (*Linum usitatissimum*), no es utilizada habitualmente en la alimentación de rumiantes, pero se conoce desde la antigüedad (siglo XIX) (Grandeau, 1876 citado por Doreau y Ferlay, 2015), en Asia, norte de África, y Europa como una fuente de alimentos y fibra. Actualmente, se cultiva en alrededor de 50 países, la mayoría de los cuales están en el hemisferio norte, donde se destacan: Canadá, China, Estados Unidos e India.

El reciente auge del uso de la semilla de lino como suplemento para el ganado vacuno se debe a su alto nivel de aceite (40% del peso total de la semilla), proteína (25%) y fibra en detergente neutro (FDN, 30%; Petit, 2010). La fracción grasa es altamente insaturada, conteniendo 85% de AG insaturados C₁₈ y una alta concentración de ALN (C_{18:3-n3}; *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3) que constituyen aproximadamente el 55% de los AG totales del aceite (Mustafa *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002, 2003; Glasser, *et al.*, 2008). Adicionalmente, la semilla de lino contiene bajas concentraciones de AL (C_{18:2n-6}) y AGS en comparación a otras fuentes como la soja, semilla de algodón, maíz y aceites hidrogenados (Maddock *et al.*, 2005). Por esta razón, se considera que la linaza es una valiosa fuente de lípidos de origen vegetal que puede influir en el nivel de AG de la leche disminuyendo los AGS, aumentando los AG insaturados, la proporción del CLA y de ALN (C_{18:3n-3}); disminuyendo omega-6:omega-3 (Suksombat *et al.*, 2013); por ello, su consumo ha ido en aumento en los países desarrollados debido a sus posibles efectos beneficiosos sobre los procesos de inmunidad y salud cardiovascular en humanos.

2.4.1.1 Efectos sobre la producción de leche

La mayoría de los estudios que han investigado la utilización de semilla de lino en la alimentación de vacas lecheras lactantes no han reportado diferencias en la producción de leche (Petit, 2003; Gonthier *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2008). Se ha determinado que la aplicación a corto plazo de suplementos de semilla de lino en la dieta de vacas produce cierto aumento sobre la producción de leche (Petit *et al.*, 2004; Moallem, 2009), pero no influye en el contenido de grasa en la leche (Petit y Benchaar, 2007), así como en la proteína (Petit y Benchaar 2007, Martin *et al.*, 2008) y la lactosa (Raes *et al.*, 2003), mientras que su aplicación a largo plazo no aumenta la producción de leche (Petit *et al.*, 2004).

En el trabajo de Petit *et al.* (2001), se utilizaron vacas lactantes alimentadas con ensilaje de centeno perenne y se observó una disminución en la producción de leche en vacas alimentadas con semilla de lino tratada con formaldehído (18,6 kg/d, 10% EE, base MS) en comparación con vacas suplementadas con jabones cálcicos de AG más un solvente de harina de lino (19,8 kg/d, 9,3% EE, base MS). De forma similar, los hallazgos de Brzówska (2006) muestran que la producción de leche de las vacas se mantuvo en un nivel similar y no difirió significativamente entre los grupos como resultado de la administración de AG-Ca de aceite de lino a una tasa de 0,0-5,6% de ración seca, lo que corresponde a una ingesta diaria de 0 a 960 g.

Contrario a estos resultados, Chouinard *et al.* (1998) y Petit *et al.* (2004) observaron efectos positivos y mejoras en la producción de leche al suplementar dietas de vacas lecheras con AG-Ca de aceite de lino (38,8 vs. 35,9 y 32,1 vs. 24,8 kg/d, respectivamente) respecto a la ración control donde no se adicionó ninguna fuente de aceite de lino. De forma similar, Côrtes *et al.*, (2010) reporta que la producción de leche y el rendimiento de grasa corregida al 4% fueron similares entre los tratamientos (base MS; 4,2% semilla entera de lino, 1,9% AG-Ca de aceite de lino y una mezcla de 2,3% semilla entera de lino + 0,8% AG-Ca de aceite de lino). Estos resultados coinciden con los de Martin *et al.* (2008) en vacas alimentadas con 12% (base MS) de semilla de lino entera en comparación con las que no recibieron lino. Por otra parte, Chouinard *et al.* (1998) informó una producción de leche similar en vacas alimentadas con una dieta control sin aceite y aquellas alimentadas con una dieta suplementada con 4% de AG-Ca de aceite de canola, aceite de soja o aceite de lino. A su vez, observó una respuesta lineal de la producción de leche al aumento de la insaturación de AG-Ca, siendo mayor para el tratamiento lino.

2.4.1.2 Efectos sobre la composición de la leche

2.4.1.2.1 Porcentaje de grasa butirosa

En estudios realizados se ha demostrado que la suplementación con semilla de lino entera con dosis de 10% MS en vacas lecheras en lactancia temprana (Petit *et al.*, 2002) y de 1,8% MS en vacas de la última etapa de la lactancia (Secchiari *et al.*, 2003) no tuvo efecto sobre la concentración de grasa butirosa, en comparación con las vacas alimentadas con una dieta sin semilla de lino. De manera similar, Martin *et al.*, (2008) no reportaron diferencias en la concentración de grasa butirosa entre las vacas que fueron suplementadas al 12% MS de lino entero y el grupo control.

Contrariamente, Côrtes *et al.* (2010) observaron que la concentración de grasa butirosa en leche utilizando AG-Ca de aceite de lino fue menor que el grupo que no contenía fuentes de grasa (0,59 vs. 0,81 kg/d, respectivamente). Previo a esto, se ha demostrado que la suplementación de AG-Ca (4% MS) de aceite de canola, aceite de soja o aceite de lino en vacas lecheras disminuyó el porcentaje de grasa de leche en comparación con la dieta control (Chouinard *et al.*, 1998). De manera similar, Fuentes *et al.* (2008) informaron un porcentaje reducido de grasa butirosa en vacas lactantes alimentadas con semilla de lino extruida (5,5% MS) en comparación con la soja extruida, y atribuyeron este efecto a la fuente de lípidos. Según Petit *et al.* (2002), estas reducciones en el porcentaje de grasa butirosa cuando se suplementa con lípidos en las dietas puede deberse al uso de grasas ricas en AG insaturados que afectan la fermentación ruminal. La depresión de la grasa butirosa puede ocurrir si la suplementación de grasa aumenta la síntesis de algunos AG *trans* (*trans*-10 C_{18:1} o *trans*-10, *cis*-12 CLA) en el licor ruminal (Bauman y Griinari, 2003).

Se ha demostrado que el *trans*-10, *cis*-12 CLA disminuye la grasa de la leche (Harvatine y Allen, 2006; Gervais *et al.*, 2009), a través de una baja regulación en la transcripción de las enzimas y proteínas que participan en la síntesis de lípidos en la glándula mamaria (Shingfield *et al.*, 2010; Maxin *et al.*, 2011). De la misma manera, se encontró que *trans*-10, *cis*-12 CLA y AG de cadena larga de la familia omega-3 (DHA), podrían ser considerados como posibles supresores de la grasa de la leche, mediado en parte por una disminución en la proteína 1 unida al elemento de respuesta de los esteroides (SREBP1), que juega un papel crítico en la regulación de la dieta sobre los genes

lipogénicos, especialmente aquellos asociados con la síntesis *de novo* (Angulo et al., 2012).

2.4.1.2.2 Porcentaje de proteína láctea

La suplementación de lípidos en la dieta tiene mayor influencia sobre la síntesis de los compuestos no nitrogenados de la leche (lactosa y grasa) que sobre la proteína. Es conocido que la suplementación lipídica provoca una disminución en el porcentaje de proteína en la leche (Chilliard, 1993; Wu y Huber, 1994; Drackley *et al.*, 2003). En un estudio realizado por Brzóska *et al.* (1999), donde suplementaron con AG-Ca de aceite de lino, observaron una disminución en el contenido de proteína en leche por un aumento de la dosis lipídica y ocurre particularmente cuando los suplementos lipídicos exceden el 2-2,5% MS en la dieta. De las fracciones proteicas de la leche, la caseína es la que más se reduce por la suplementación lipídica (Chow *et al.*, 1990; Cant *et al.*, 1991 citados por Wu y Huber, 1994); a su vez, ésta es sintetizada *de novo* en la glándula mamaria, y su disminución por la adición de lípidos sugiere que el mecanismo causante reside en el tejido mamario.

Existen diversas hipótesis para explicar la disminución en el contenido de proteína y caseína de la leche de vacas suplementadas con lípidos (DePeters y Cant, 1992; Wu y Huber, 1994). En una revisión de 49 ensayos, Wu y Huber, (1994) recolectaron 83 comparaciones (control vs. suplementación lipídica; Figura 2.9) efectuando un análisis de regresión que dio lugar a la siguiente ecuación: $y = 101,1 - 0,6381x + 0,0141x^2$, donde y = porcentaje ajustado del tenor proteico y x = porcentaje de grasa en la dieta, ($r^2 = 0,24$, $P < 0,01$). Los resultados reflejaron que, de las 83 comparaciones, 26 estudios presentaron una disminución en la proporción de proteína láctea, mientras que en el resto no hubo modificación o hubo un aumento (Figura 2.9). Estos autores propusieron que el aumento de la producción de leche de las vacas por efecto de la suplementación con lípidos, incrementaría los requerimientos de aminoácidos en la glándula mamaria para mantener constante la concentración de proteína láctea y sugirieron que al aumentar la absorción de aminoácidos que limitan la síntesis de proteínas láctea (añadiendo aminoácidos o aumentando la síntesis de proteínas microbianas en el rumen), se puede prevenir la reducción de la proteína en la leche en vacas que reciben un suplemento lipídico.

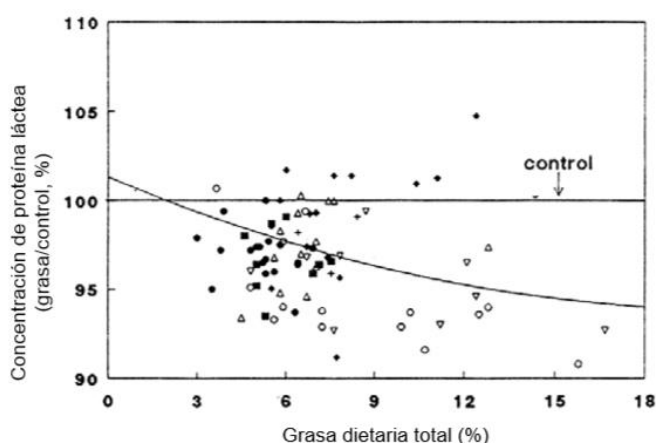


Figura 2.9 Concentraciones de proteína láctea de vacas suplementadas con lípidos respecto al grupo con dietas control (línea basal, 100%) Fuentes de grasa: mezcla de grasa animal-vegetal (+); AG-Ca(Δ); prilled-fat (◊); sebo bovino protegido (○); sebo bovino (▽); semillas oleaginosas (●) y grasa amarilla (■). Fuente: adaptado de Wu y Huber, (1994)

Por otro lado, Schingoethe *et al.* (1996) reportan que la disminución del contenido proteico de la leche podría deberse a una síntesis más eficiente de la lactosa. Al ser la lactosa un constituyente osmótico importante en la leche y tener una concentración constante, se puede observar que, al aumentar la síntesis de lactosa, la producción de leche también se ve aumentada. Asimismo, Murphy y O'Mara (1993) consideran que otra posible causa puede deberse a un efecto indirecto sobre el flujo de proteína microbiana, de modo que éste disminuye.

En cuanto al efecto de la suplementación con semilla de lino sobre la concentración de la proteína láctea, los resultados parecen ser contradictorios (Ward *et al.*, 2002; Petit, 2003; Gonthier *et al.*, 2005). La semilla de lino contiene 25% de proteína, y se ha demostrado que cuando se utiliza como suplemento en las dietas de vacas lecheras, puede aumentar la concentración y el rendimiento de la proteína de la leche en comparación con otras fuentes de lípidos como la soja micronizada o AG-Ca de aceite de palma (Petit, 2002).

Uno de los posibles factores que contribuye al cambio en la proteína de la leche puede ser el método de procesamiento de la semilla de lino y la dosis suplementada. Se informó que la proteína de la leche aumentó cuando se suplementó con semilla de lino entera en comparación con semillas tratadas con formaldehído (Petit *et al.*, 2001). Contario a esto, otros estudios reportan una disminución en el porcentaje de proteína láctea y en el rendimiento de la leche al suplementar con semillas de lino molida en comparación con una dieta control constituida por igual energía y proteína cruda (base MS), sin la adición de lípidos (Ward *et al.*, 2002).

2.4.1.2.3 Perfil de ácidos grasos

Existen distintos parámetros para determinar si una composición de AG es deseable, entre ellos, el porcentaje de AG *trans*, de CLA, AGPI esenciales y la relación omega-6 / omega-3. La suplementación con AGPI generalmente aumenta el porcentaje de AG C_{18:0} en la leche y disminuye los AG de cadena corta y media, lo que puede ser debido a una inhibición en la síntesis *de novo* por los AG de cadena larga (Barber *et al.*, 1997), o por sustitución de AG de cadena corta y media por AG de cadena larga sobre los triglicéridos de la leche (Hansen y Knudsen, 1987; Stoffel *et al.*, 2015).

El ALN (C_{18:3n-3}) presente en el aceite de lino, presenta potencialidad para incrementar los niveles de *cis*-9, *trans*-11 CLA en la grasa de la leche (Gómez *et al.*, 2008) y un menor riesgo de incrementar el C_{18:1 trans}-10. La suplementación con aceite de lino protegido puede también disminuir la relación omega-6/omega-3 en leche de vacas, cabras (Gagliostro, 2004a; 2004b) y ovejas (Gómez *et al.*, 2010).

En el estudio realizado por Brózka (2006), se reportó un aumento en el contenido de AG de cadena media de 18 átomos de carbono en la leche de vacas suplementadas con AG-Ca de aceite de lino respecto al grupo control sin suplementación lipídica. En dicho estudio, se observó también una disminución en el nivel de AGS en la leche, en especial los AG mirístico, palmítico y un aumento de 0,84-2,19% en el contenido de ALN (C_{18:3n-3}) en leche. De la misma manera, Aii *et al.* (1991) suplementó a vacas lecheras con AG-Ca de aceite de lino (0-500 g/día) y encontró que el nivel de ALN (C_{18:3n-3}) en leche aumentó de 0,49 a 1,95% respecto al grupo control sin suplementación lipídica.

En un meta-análisis sobre la respuesta de la composición de AG de la leche de vaca a los suplementos lipídicos de semillas oleaginosas, se ha demostrado que la inclusión de lino en la dieta provocó una reducción en la concentración de AG de cadena corta (C_{4:0} a C_{12:0}) y C_{16:0}, mientras que la concentración de AG mono-insaturados y de cadena larga se incrementó en comparación con los animales de una dieta control. Hubo variaciones en la concentración total de AG C_{18:0} desde un 35% en vacas no suplementadas con lípidos a valores de 45 a 58% en vacas suplementadas (Glasser *et al.*, 2008). El grado de cambio en la concentración de AG en la leche es proporcional al nivel de inclusión de la linaza en la dieta (Petit y Gagnon, 2009); sin embargo, la concentración de AGPI en la leche de vacas alimentadas con lino usualmente no exceden el 3 al 4% del total de AG (Kenelly, 1996). Los porcentajes de los AG *trans*-18:1 y el CLA total en la grasa láctea aumentaron linealmente con el incremento de la cantidad de lino en la dieta (Glasser *et al.*, 2008). Un porcentaje relativo mayor del *trans*-18:1 en la grasa de la leche también se ha informado previamente cuando se suministraron dietas a vacas lecheras conteniendo aceite de lino en comparación a cuando se suministraron dietas con soja cruda quebrada (Dhiman *et al.*, 2000).

Las concentraciones de AG omega-3 en la grasa de la leche aumentan con dietas a base de linaza, aunque los experimentos con suplementos de lino reportaron aumentos de no más del 1% de los AG totales (Glasser *et al.*, 2008). La inclusión en la dieta de aceite de lino en forma de semillas extruidas, micronizadas o molidas disminuyó las concentraciones de C_{6:0} a C_{8:0}, C_{10:0} a C_{14:0} y C_{16:0} y aumentó las de C_{18:0}, *trans*-18:1, CLA y ALN (C_{18:3n-3}) en la grasa de la leche respecto de la inclusión de las semillas enteras (Glasser *et al.*, 2008). El procesamiento físico de la semilla de lino puede contribuir a aumentar la biohidrogenación ruminal parcial del ALN (C_{18:3n-3}), como lo demuestra la mayor concentración de *cis*-9, *trans*-11 18:2 en la grasa de la leche de las vacas alimentadas con dietas con grasa de lino suministrada como semillas extrusionadas, micronizadas o molidas (Glasser *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la disminución de los AGS potencialmente aterogénicos de cadena media (C_{12:0} a C_{16:0}) y un incremento en los AGPI de cadena larga puede mejorar el valor nutracéutico de la leche (Glasser *et al.*, 2008), por lo tanto, la suplementación con fuentes lipídicas provenientes de semillas oleaginosas constituye una estrategia válida para incrementar la calidad de los productos lácteos y satisfacer la demanda de los consumidores.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización y unidad de análisis

Este ensayo constituye parte de un proyecto global cuyo objetivo principal fue evaluar el impacto del consumo de omega-3 sobre la reproducción, y al mismo tiempo, abarcar y evaluar otros aspectos productivos vinculados al uso de omega-3 en vacas lecheras. El ensayo se llevó a cabo en el tambo Experimental de la EEA Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), provincia de Santa Fe (Lat. 31° 12' S Long. 61° 30' O Alt. 99 m). El período experimental tuvo una duración de 12 semanas (2 semanas de acostumbramiento a los lípidos y 10 semanas de toma de datos) en un período comprendido entre agosto y diciembre de 2015.

Para las mediciones de producción y composición de leche, peso vivo (PV) y condición corporal (CC) se utilizaron 36 vacas multíparas de raza Holando Argentino con $56,4 \pm 3,0$ días de lactancia, $586,8 \pm 15,4$ kg PV, $2,3 \pm 0,2$ lactancias y $37,7 \pm 1,5$ kg leche d⁻¹ al inicio del ensayo. Las mismas fueron distribuidas en 18 bloques por fecha de parto, N° de lactancias, PV, CC y nivel de producción en la lactancia previa, y asignadas aleatoriamente dentro de cada bloque a los tratamientos.

Todas las vacas estuvieron equipadas con transponders en el cuello que se utilizaron para registrar la producción diaria de leche (ALPRO versión 6.60/ DeLaval, Tumba, Suecia). Para los estudios de ambiente ruminal, se seleccionaron 12 vacas (6/tratamiento) de las 36 vacas utilizadas para el ensayo, considerando los bloques asignados previamente con el objetivo de mantener el balance inicial propuesto al momento de asignar los tratamientos.

3.2 Tratamientos

Sobre una misma base forrajera constituida por pasturas perennes a base de alfalfa (*Medicago sativa*), se implementaron dos tratamientos:

- **Omega-3 (O3):** 4,0 kg día⁻¹ balanceado comercial + 1,0 kg día⁻¹ maíz molido + 0,850 kg día⁻¹ sales cálcicas (base tal cual) (Tabla 3.4).
- **Control (C):** ídem O3 pero se reemplazaron los lípidos por maíz molido de modo tal que los concentrados fuesen isoenergéticos (equivalencia: 1 kg MS sales cálcicas = 2 kg MS maíz).

La cantidad de lípidos suplementada fue equivalente a 0,615 kg día⁻¹ sales cálcicas (base seca). Tanto las sales cálcicas como el maíz molido se mezclaban con el balanceado. La determinación de la dosis de lípidos utilizada en este trabajo de investigación estuvo basada en estudios previos que indican que niveles de suplementación con aceite de lino (contenido en semilla de lino entera o aplastada) dentro del rango de 0,600-0,720 kg/vaca/día tendrían efectos favorables sobre el comportamiento reproductivo (Petit, Germiquet y Lebel, 2004; Ambrose *et al.*, 2006; Petit y Twagiramungu, 2006).

La cantidad diaria de concentrado se suministró en comederos individuales, en partes iguales durante cada turno de ordeño. Los lípidos evaluados fueron elaborados a partir de AG provenientes de aceite de lino saponificados con hidróxido de calcio (83,3% MS, 86,8% EE, 13,2% cenizas y 36% de C_{18:3n-3}). El valor de energía digestible (ED) del suplemento lipídico estimado en base a las ecuaciones del NRC (2001) fue de 6,50 Mcal/kg de MS. Para pasar de ED a energía metabolizable (EM) se asume 100% ya que las pérdidas son prácticamente nulas, por lo tanto, el contenido de EM de los lípidos se asumió en 6,50 Mcal/kg.

Adicionalmente, a las vacas de ambos tratamientos se les suministró una vez al día (luego del ordeño de la mañana) 13,5 kg MS vaca⁻¹ de TMR conteniendo (%MS): silaje de planta entera de maíz (63,5%), harina de soja (18%), maíz molido (10,6%) y heno de alfalfa (7,9%). Para el suministro de la TMR las vacas fueron alojadas en forma conjunta en un corral seco con piso consolidado con cal (dry-lot), de 48 m de frente x 70 m de largo (93 m²/vaca). Las vacas permanecieron en dicho corral por aproximadamente 8 h, hasta verificar el consumo total de la TMR asignada. Luego, las vacas fueron retiradas del dry-lot y conducidas a la parcela de pastoreo. Se empleó un sistema de pastoreo rotativo en forma conjunta de todos los animales, en franjas diarias mediante el uso de alambrados eléctricos. El área de la franja se ajustó semanalmente a fin de asegurar una oferta de forraje de 12 kg MS vaca⁻¹día⁻¹.

Tabla 3.4 Composición y cantidad diaria de concentrado suministrado a cada tratamiento.

Componentes	Tratamiento	
	C	O3
Balanceado Comercial, kg día ⁻¹	4,0	4,0
Maíz molido, kg día ⁻¹	2,55	1,0
Sales cálcicas de aceite de lino ² , kg día ⁻¹	-	0,850
Total, kg día ⁻¹	6,55	5,85
Total, kg día ⁻¹ de MS	5,90	5,20

Para la formulación de la ración experimental se utilizó el programa NRC Dairy Cattle (2001) tomando como modelo una vaca de 600 kg de peso vivo, que produce 40 kg de leche día⁻¹ con una concentración de 35 g kg⁻¹ de grasa y 33 g kg⁻¹ de proteína y que no gana ni pierde peso. El consumo de pastura de alfalfa objetivo en función de esta formulación fue de 6 kg MS vaca⁻¹ día⁻¹. El nivel de asignación fue el doble del consumo objetivo (Bargo *et al.*, 2003), 12 kg MS vaca⁻¹ día⁻¹.

Durante las 3 semanas previas al comienzo del ensayo todas las vacas recibieron la dieta control. La producción de leche promedio de cada vaca durante este período pre-experimental se utilizó como covariable.

3.3 Mediciones

3.3.1 Sobre las vacas en producción

3.3.1.1 Producción de leche

La producción de leche se midió en forma individual y diaria por un sistema de medición de leche DeLaval ALPRO (DeLaval Internacional AB, Tumba, Suecia), computándose los promedios semanales.

3.3.1.2 Composición de leche

La composición de la leche se evaluó a partir de muestras individuales colectadas semanalmente. Se tomaron dos submuestras de leche de cada vaca en ordeños consecutivos (mañana y tarde) utilizando medidores de leche (DeLaval Internacional AB, Tumba, Suecia), confeccionando luego una muestra compuesta por individuo, en la cual la participación de cada submuestra fue proporcional a la producción de cada ordeño. En cada muestra compuesta se determinó el contenido de grasa butirosa (GB), proteína total,

lactosa, sólidos totales (ST), sólidos no grasos (SNG) y urea por espectrofotometría infrarroja (MilkoScanTM Minor; FOSS Electric, Hilleroed, Denmark) según norma ISO 9622 IDF 141 (2013). El contenido de caseína se determinó mediante la fórmula: $6,38 * (N \text{ total} - N \text{ no caseínico})$, previa digestión semiMicro-Kjeldhal y el de proteína verdadera se estimó según el NRC (2001). La producción de leche se ajustó a un contenido de 4% de grasa (LGC4%) por la fórmula de Gaines y Davidson (1923). La producción de leche corregida por energía (LEC) se calculó según la fórmula de Tyrrel y Reid (1965).

Alícuotas individuales de leche (100 ml) se colectaron en un único muestreo durante la sexta semana del período de toma de datos y se almacenaron a -24°C para la posterior determinación del perfil de AG. Sobre cada muestra se efectuó una extracción de lípidos según el protocolo de Luna *et al.* (2005). Se realizó metilación alcalina de los AG con KOH en metanol de acuerdo con procedimiento ISO-IDF (ISO –IDF, 2002) y luego se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso (ISO 15885-IDF) marca Varian, modelo CP3800, con inyector PSS (Programmed Temperature Vaporizer), divisor de flujo y detector de ionización de llama (FID). Los ésteres metílicos de los AG se separaron utilizando una columna capilar CP-Sil 88 (100m*0,25mm*0,20µm of Varian CP7489), usando helio como carrier. Los AG individuales fueron identificados comparando los tiempos de retención relativos con estándares individuales de ácidos grasos (PUFA-2 Animal Source, Grain Fatty acid Methyl Ester Mix, Octadecadienoic acid, conjugated, methyl ester, trans-11-Vaccenic Methyl Ester, cis-11-Vaccenic Methyl Ester, trans-9-Elaidic Methyl Ester and 37-Component FAME mix, Sigma-Aldrich, USA). Los resultados analíticos fueron expresados como porcentajes del total de AG.

3.3.1.3 Variación de peso vivo y condición corporal

Las vacas fueron pesadas individualmente con una balanza electrónica cada 7 días, luego del ordeño de la mañana e impidiéndoles el acceso al agua aproximadamente 2 h previas a la pesada. La variación diaria de PV entre dos pesadas sucesivas se calculó como la diferencia entre el peso final menos el peso inicial dividido por la cantidad de días transcurridos. Junto con la pesada se determinó la CC por dos observadores independientes usando una escala de 5 puntos (1 = extremadamente flaca y 5 = extremadamente gorda) con incrementos de 0,25 (Wildman *et al.*, 1982) y el valor analizado fue el resultado promedio de ambos evaluadores.

3.3.1.4 Consumo de materia seca y energía

El consumo diario individual de concentrado se determinó por la diferencia entre lo ofrecido y lo rechazado a lo largo de todo el ensayo. El consumo individual de pastura se estimó durante la 8° semana del período de toma de datos a partir de la producción de heces de cada animal y de la digestibilidad *in vitro* de materia seca (**DIVMS**) de la pastura. Durante este período las vacas se alojaron en corrales individuales para el suministro de la TMR. El consumo individual de TMR se determinó por la diferencia entre lo ofrecido y lo rechazado.

La producción total de heces de cada vaca se determinó a través de un marcador indigestible (LIPE, lignina purificada y enriquecida de *Eucalyptus grandis*). Saliba *et al.* (2003) aislaron la lignina purificada de madera de *Eucalyptus grandis* y la enriquecieron con grupos fenólicos no encontrados en la lignina de la dieta animal, dando origen a este marcador hidroxifenil propano modificado, que ha demostrado ser un estimador confiable de la producción fecal para distintas especies animales, incluyendo bovinos (Rodríguez, Saliba y Guimaraes-Junior, 2007; Santos *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Franco *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2015; dos Santos *et al.*, 2015; Saliba *et al.*, 2015).

y que además había sido evaluado en ensayos previos en la EEA Rafaela (Salado *et al.*, 2010; Baudracco *et al.*, 2013; Salado *et al.*, 2017).

Las vacas fueron dosificadas una vez por día (8:00 a.m) con una cápsula de gelatina conteniendo 500 mg de LIPE (Saliba *et al.*, 2015) durante 7 días consecutivos, comenzando el día 1 y finalizando el día 7, utilizando un lanzabolos. Ante la posibilidad de que las cápsulas fuesen regurgitadas, los animales fueron observados individualmente durante 3 minutos después de haber sido dosificados y se realizó una inspección cuidadosa del corral durante 20 minutos después de la dosificación. Las concentraciones de LIPE alcanzan el equilibrio en las heces aproximadamente 48 horas después del inicio de la dosificación (Rodríguez *et al.*, 2007). Por lo tanto, durante 5 días consecutivos, a partir del día 4 de dosificación con LIPE hasta el día 8, se recolectaron muestras de heces rectales de cada vaca una vez por día (8 a.m) (Rodríguez *et al.*, 2007; Saliba *et al.*, 2015). Todas las muestras fecales fueron procesadas y analizadas individualmente. Cada una de ellas fue secada inmediatamente después del muestreo hasta peso constante (estufa a 60 °C con circulación forzada de aire), luego fue molida en molino tipo Willey (malla 1mm) y almacenada para su posterior análisis. La determinación del contenido de LIPE en las muestras fecales se realizó en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) mediante espectrofotometría infrarroja (Saliba *et al.*, 2015). La concentración resultante de LIPE en las heces se expresó teniendo en cuenta el contenido de MS obtenido mediante el secado de las muestras de materia fecal a 105 °C hasta peso constante.

En 11 estudios involucrando distintas especies y con frecuencias de recolección de heces de 1 o 2 veces por día, los valores de producción fecal estimados por LIPE fueron similares a los obtenidos por colección total de heces, con tasas de recuperación fecal que fueron desde 95,5 a 106,9% (Saliba *et al.*, 2015). Por lo tanto, en el presente estudio se asumió una tasa de recuperación de 100% para LIPE en el cálculo de la producción total de heces.

La producción de heces asociada al concentrado se calculó como el producto de la indigestibilidad del concentrado (1-DIVMS) por el consumo de concentrado. La producción de heces asociada a la TMR se calculó como el producto de la indigestibilidad de la TMR (1-DIVMS) por el consumo de TMR. La producción de heces asociada al consumo de pastura se determinó a través de la diferencia entre las heces totales y las heces asociadas al consumo de concentrado y de TMR. El consumo de pastura se estimó a partir del cociente entre la producción de heces asociada a la pastura y la indigestibilidad (1-DIVMS) de la pastura (Hamilton, Ashes y Carmichael, 1992). Se utilizó la siguiente ecuación (Bargo *et al.*, 2002):

$$\text{Consumo MS pastura} = [(\text{g LIPE/d})/(\text{g LIPE/g MS fecal}) - \text{consumo MS concentrado} \times (1-\text{DIVMS concentrado}) - \text{consumo MS TMR} \times (1-\text{DIVMS TMR})] / (1-\text{DIVMS pastura}).$$

Agregar la información del comentario YM65 referido a la determinación de la DIVMS. El consumo de MS total se calculó como la suma del consumo de MS de concentrado, de TMR y de pastura. El consumo de energía neta de lactancia (ENL) se calculó en base a las ecuaciones del NRC (2001). Agregar info de comentarios Revisor66 y YM67.

3.3.1.5 Ambiente ruminal

La caracterización del ambiente ruminal se realizó mediante mediciones de pH, concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y de ácidos grasos volátiles (AGV) durante la 9 semana del período de toma de datos. Para ello se extrajeron aproximadamente 20 ml de licor ruminal del saco ventral por ruminocentesis, realizando

un único muestreo. Sobre esas muestras se midió el pH con un pH-metro digital portátil modelo Altronix, inmediatamente después de haber extraído el licor ruminal y previo filtrado con tela tipo quesería. De los 20 ml extraídos, 9,9 ml fueron conservados con 0,1 ml de una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 98% y congelados a -20°C para posteriormente realizar la determinación de AGV. Adicionalmente, se utilizaron 4 ml para determinación de N-NH_3 , los cuales fueron conservados con 4 ml de HCl 0,2 M y congelados a -20°C . Las muestras luego de ser descongeladas, se centrifugaron a 10000 g por 15 min a 0°C (Eppendorf, modelo Centrifuge 5810R). La determinación de la concentración de AGV fue realizada mediante cromatografía gaseosa con purificación con ácido ortofosfórico 25% en ácido sulfúrico 0,5M a razón de 0,5 ml cada 2 ml de muestra y centrifugadas por 10 minutos a 5000 g (Friggens *et al.*, 1998). La concentración de nitrógeno amoniacal se determinó mediante espectrofotometría (Espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific, modelo Genesys 10-S) en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de Buenos Aires.

3.3.2 Sobre los alimentos

3.3.2.1 Biomasa de forraje

Semanalmente se estimó la disponibilidad forrajera (kg MS ha^{-1}) mediante cortes a 4 cm de altura (Comeron *et al.*, 1995) con tijera manual en un área delimitada por un marco metálico de $0,125 \text{ m}^2$, cortando una superficie total de 1 m^2 en cada muestreo. La muestra, compuesta por 8 submuestras de $0,125 \text{ m}^2$, fue secada en estufa a 60°C durante 48 h para determinar el contenido de MS de la misma. Sobre la base de esta estimación se fijó el área de las franjas diarias según la asignación de pastura establecida.

3.3.2.2 Calidad de los alimentos

Semanalmente se tomaron muestras del concentrado, de la TMR, de los ingredientes que la componen y de la pastura. Estas últimas se obtuvieron en el horizonte de pastoreo en forma manual simulando la selectividad de la vaca (hand-plucking) (Meijs, Walters y Keen, 1982). Todas las muestras fueron secadas en estufa con circulación forzada de aire a 65°C hasta peso constante para determinar el contenido de MS y molidas en molino tipo Willey (malla 1 mm). Se determinó el contenido de fibra detergente neutro (FDN; Komarek, 1993), fibra detergente ácido (FDA; AOAC, 1990, # 973.18), extracto etéreo (EE; AOAC, 1998, # 920.39), lignina detergente ácido (LDA; AOAC, 1990, # 973.18), nitrógeno total (método Kjeldhal, AOAC, 1998, # 976.05), proteína bruta (PB; nitrógeno total x 6,25), cenizas (AOAC, 1990, # 942.05) y digestibilidad in vitro de la MS (DIVMS; técnica de fermentación en dos etapas de Tilley y Terry, 1963).

3.4 Análisis Estadístico

Los datos referidos a producción y composición de leche y cambios de PV y CC se analizaron según un diseño en bloques completos aleatorizados con medidas repetidas en el tiempo ajustado por covariable:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + W_k + (TW)_{ik} + Cov + E_{ikl(j)}$$

Donde:

Y_{ijk} = observación correspondiente al i-ésimo tratamiento, en el j-ésimo bloque con el l-ésimo animal, en la k-ésima semana de muestreo;

μ = media general del ensayo;

T_i = efecto del tratamiento i;

B_j = efecto del bloque j;

W_k = efecto de la semana de muestreo k;

$(T*W)_{ik}$ = efecto de la interacción tratamiento i por semana de muestreo k;

Cov = efecto de la covariable;

E_{ijkl} = error residual asociado a la ijkl observación.

Los datos de consumo, parámetros de ambiente ruminal y composición en AG de la leche se analizaron por medio de un modelo a un criterio de clasificación (tratamiento):

$$Y_{ijl} = \mu + T_i + B_j + E_{ijl(j)}$$

Donde:

Y_{ijl} = observación correspondiente al i-ésimo tratamiento, en el j-ésimo bloque con el l-ésimo animal;

μ = media general del ensayo;

T_i = efecto del tratamiento i;

B_j = efecto del bloque j;

E_{ijl} = error residual asociado a la ijl observación.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (2010).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Características de la pastura y del concentrado

Los datos de composición química de la pastura muestran el contenido de MS (21%).

Tabla 4.5 Composición química y digestibilidad de la pastura¹ ofrecida a vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día⁻¹) bajo la forma de sales cálcicas.

Parámetro	Valores ²
MS, %	20,93 ± 1,81
DIVMS, %	76,76 ± 7,74
PB, % MS	25,47 ± 2,08
FDN, % MS	24,96 ± 5,31
FDA, % MS	15,71 ± 3,67
LDA, % MS	3,61 ± 1,44
EE, % MS	4,98 ± 2,75

¹Pastura perenne de alfalfa (*Medicago sativa*). ²Valores expresados a través del promedio ± el desvío estándar sobre 7 muestras analizadas. MS= materia seca, PB= proteína bruta, FDN= fibra detergente neutro, FDA= fibra detergente ácido, LDA= lignina en detergente ácido, EE= extracto etéreo, DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la MS.

Los valores de FDN y FDA resultaron bajos. La concentración de extracto etéreo resultó normal en función a la época del año (Tabla 4.5). El contenido promedio de MS del silaje de maíz utilizado fue de 48% (Tabla 4.6). La TMR presentó un alto contenido de MS (67%) y de digestibilidad de la MS (70%) (Tabla 4.6).

Tabla 4.6 Composición química de los alimentos utilizados y de la TMR.

Alimentos	Parámetros						
	MS, %	DIVMS, %	PB, %MS	FDN, % MS	FDA, % MS	LDA, % MS	EE, % MS
TMR ^{1*}	67,59±3,4	69,42±1,7	15,97±3,4	30,65±5,0	19,77±3,9	3,24±1,0	3,46±0,7
Silaje de maíz (planta entera) ²	48,39±7,1	sd	7,12±0,6	39,83±2,3	22,49±1,8	2,11±0,8	4,24±1,2
Heno de alfalfa ³	89,77±0,8	sd	12,74±7,6	62,40±15,4	39,12±9,9	6,73±0,7	1,36±0,4
Grano de maíz seco, molido ³	86,73±4,1	sd	8,27±0,2	9,92±1,7	2,94±1,3	1,04±1,1	6,35±2,6
Harina de soja ²	85,28±10,4	sd	49,33±1,7	11,83±4,0	6,51±1,5	1,19±0,8	1,96±0,8
Balanceado Comercial ¹	90,48±0,4	87,52±2,1	12,63±0,6	13,44±1,1	3,99±0,6	1,26±0,6	3,99±0,8
Sales cálcicas de AG	83,3	sd	sd	sd	sd	-	86,8

¹Valores expresados a través del promedio (± desvío estándar) sobre 6 muestras analizadas; ²Valores expresados a través del promedio (± desvío estándar) sobre 4 muestras analizadas; ³Valores expresados a través del promedio (± desvío estándar) sobre 3 muestras analizadas; FDN= fibra detergente neutro, FDA= fibra detergente ácido, LDA= lignina en detergente ácido, EE= extracto etéreo, DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la MS; sd= sin dato.

4.2 Consumo de MS

El consumo total de MS fue estimado utilizando el NRC (2001) dado que los valores de LIPE no resultaron confiables. El consumo de MS de pastura se estimó descontando los consumos de MS de TMR y concentrado (determinados por el método de diferencia) del consumo total de MS. Los consumos de TMR y de MS total (kg d^{-1}) resultaron similares entre tratamientos (Tabla 4.7). El consumo de concentrado efectivo 75% de utilización, resultó mayor (+ 33%, $P < 0,01$) en el grupo control, probablemente como consecuencia de una menor palatabilidad del concentrado en el grupo O3 (Tabla 4.7). Se detectó una tendencia ($P = 0,06$) a un mayor consumo de MS de pastura (+ 65%) en O3 con respecto al grupo control, posiblemente asociado al menor consumo de concentrado de este último. Al evaluar el comportamiento en pastoreo en un estudio complementario al presente referido al comportamiento ingestivo (Olmeda *et al.*, 2017), se observó que las vacas O3 dedicaron significativamente más tiempo a pastoreo ($P = 0,013$) y menos tiempo a descanso ($P = 0,017$), en sintonía con el mayor consumo de MS de pastura observado en este grupo de vacas (Olmeda *et al.*, 2017).

Tabla 4.7 Consumo de MS en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido ($0,85 \text{ kg día}^{-1}$) bajo la forma de sales cálcicas.

Consumo, kg MS d^{-1}	Tratamiento ¹		EEM	P-valor
	O3	C		
Pastura ²	5,58	3,38	0,70	
Concentrado	3,90	5,90	0,07	0,0001
TMR	13,14	12,80	0,11	0,0781
Total²	22,65	22,08	0,70	

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMeans (EEM).

²Valores promedios provenientes de las estimaciones realizadas mediante el uso del NRC.

4.3 Variación de peso vivo y condición corporal

No se observaron diferencias entre los tratamientos ($P = 0,50$) para los valores de peso vivo (PV) durante el período experimental (Figura 4.11). La interacción tratamiento*semana tampoco resultó significativa ($P = 0,52$), indicando que la falta de respuesta a los tratamientos fue independiente de la semana del período experimental.

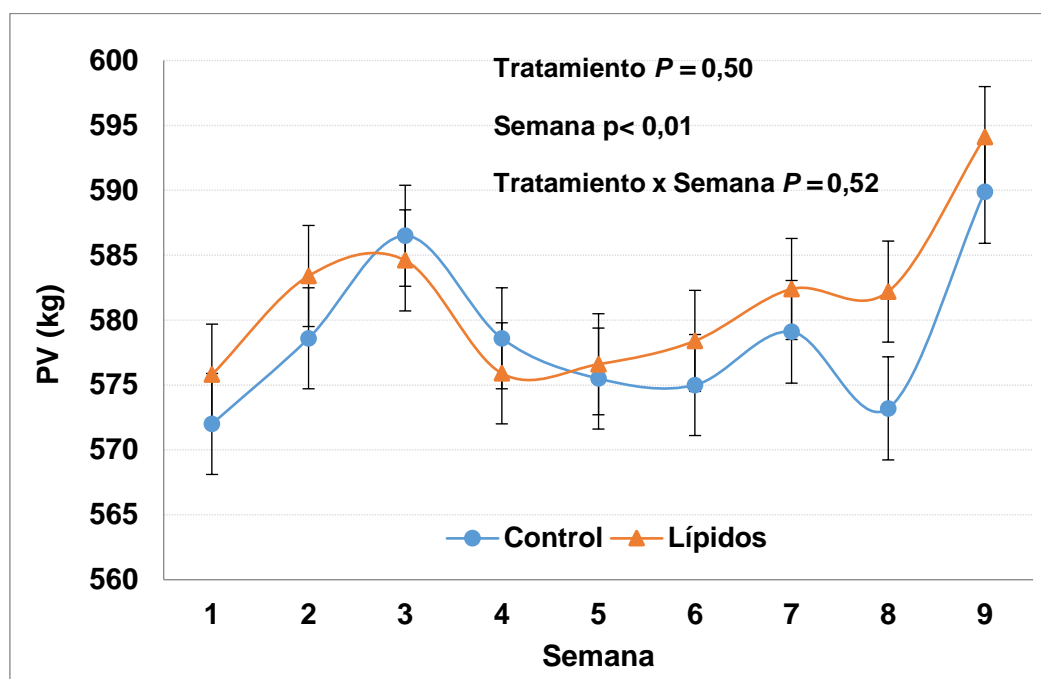


Figura 4.10 Evolución del peso vivo datos en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido ($0,85 \text{ kg día}^{-1}$).

PVi: a partir del período de toma datos.

Resultados similares fueron obtenidos cuando la variable respuesta analizada fue la evolución de la condición corporal (CC; Figura 4.11).

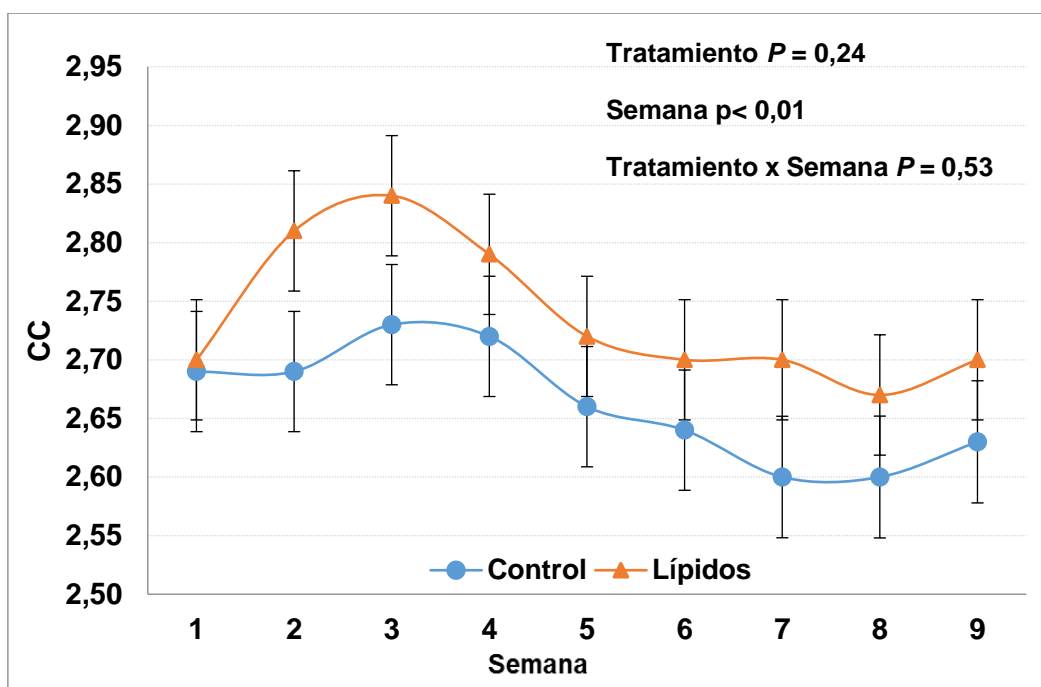


Figura 4.11 Evolución de la condición corporal en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido ($0,85 \text{ kg día}^{-1}$).

CCi: a partir del período de toma datos.

4.4 Ambiente ruminal

No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los parámetros de ambiente ruminal evaluados (Tabla 4.8). Se observó una tendencia a una mayor concentración de N-NH₄ en las vacas suplementadas con O3 (+16 %) con respecto al grupo control, lo cual resulta compatible con los mayores niveles de urea en leche observados en este grupo de vacas.

Tabla 4.8 Ambiente ruminal en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con sales cálcicas de aceite de lino protegido (0,85 kg día⁻¹).

Parámetro	Tratamiento ¹		EEM	P-valor ²
	O3	C		
AGVt (mmol L ⁻¹)	94,03	94,08	6,90	0,99
Acetato (mmol L ⁻¹)	61,07	62,40	4,84	0,85
Acetato (mol 100 mol ⁻¹)	65,33	66,33	1,32	0,61
Propionato (mmol L ⁻¹)	24,93	22,03	2,90	0,51
Propionato (mol 100 mol ⁻¹)	25,80	23,33	1,62	0,33
Butirato (mmol L ⁻¹)	8,05	9,68	1,58	0,50
Butirato (mol 100 mol ⁻¹)	8,87	10,32	1,76	0,59
Relación acetato:Propionato	2,62	2,88	0,18	0,35
pH	6,10	6,13	0,26	0,95
N-NH ₄ (mg dl ⁻¹)	19,14	16,42	1,02	0,12

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMeans (EEM). ²Efecto tratamiento. N-NH₄= amonio; AGVt= ácidos grasos volátiles totales.

4.5 Producción y Composición de leche

La producción de leche, LGC4%, LEC y proteína resultaron similares ($P > 0,05$) entre tratamientos (Tabla 4.9). Aunque el tenor graso de la leche sufrió una disminución (-4,6% comparado con el grupo control) en el grupo de vacas O3, no pudo detectarse significancia estadística ($P = 0,21$). Sin embargo, la interacción tratamiento*semana resultó significativa para producción y contenido de grasa ($P = 0,02$ y $P = 0,03$ respectivamente). Esto indica que la respuesta a la suplementación lipídica varió en función de la semana del ensayo (Figura 4.12), detectándose diferencias significativas entre tratamientos sólo en la 3° semana del período experimental a favor del grupo control ($P < 0,01$) (1,39 vs. 1,13 kg d⁻¹ y 3,86 vs. 3,23 % para producción y tenor de grasa, respectivamente).

Tabla 4.9 Producción y composición de la leche en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día⁻¹) durante 10 semanas.

Variable	Tratamiento ¹		EEM	P-valor ²		
	O3	C		Trat	Sem	Trat*Sem
Leche, kg d ⁻¹	33,4	33,8	0,85	0,72	0,01	0,88
LGC4%, kg d ⁻¹	29,9	31,1	0,95	0,40	0,01	0,22
LEC, kg d ⁻¹	29,8	30,9	0,92	0,40	0,01	0,20
Grasa %						
%	3,31	3,47	0,08	0,21	0,01	0,02
kg d ⁻¹	1,10	1,17	0,04	0,20	0,01	0,03
Proteína total						
%	3,11	3,14	0,04	0,54	0,01	0,21
kg d ⁻¹	1,03	1,06	0,03	0,41	0,01	0,52
Proteína verdadera, %	2,89	2,92	0,04	0,54	0,01	0,21
Lactosa, %	4,87	4,83	0,02	0,17	0,01	0,09
ST, %	12,14	12,27	0,12	0,50	0,01	0,16
SNG, %	8,75	8,72	0,04	0,53	0,01	0,78
Caseína, %	2,49	2,48	0,02	0,60	0,01	0,45
Urea, %	0,039	0,037	0,001	0,02	0,01	0,20

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMeans (EEM). ²Efectos de tratamiento (Trat), semana de lactancia (Sem) e interacción tratamiento*semana (Trat x Sem). LGC4%= leche corregida al 4% de grasa; LEC= leche energía corregida; ST = sólidos totales; SNG = sólidos no grasos.

No se detectaron diferencias entre tratamientos ($P = 0,54$) en la concentración de proteína en leche promediando 31,2 g/kg de leche. Los contenidos de lactosa, ST, SNG y caseína no resultaron afectados ($P > 0,05$) por la suplementación con O3 (Tabla 4.9). El contenido de urea en leche resultó levemente mayor (+5%, $P = 0,02$) en las vacas suplementadas con O3 respecto al grupo control (Tabla 4.9), posiblemente asociado a una menor disponibilidad de energía fermentecible en rumen.

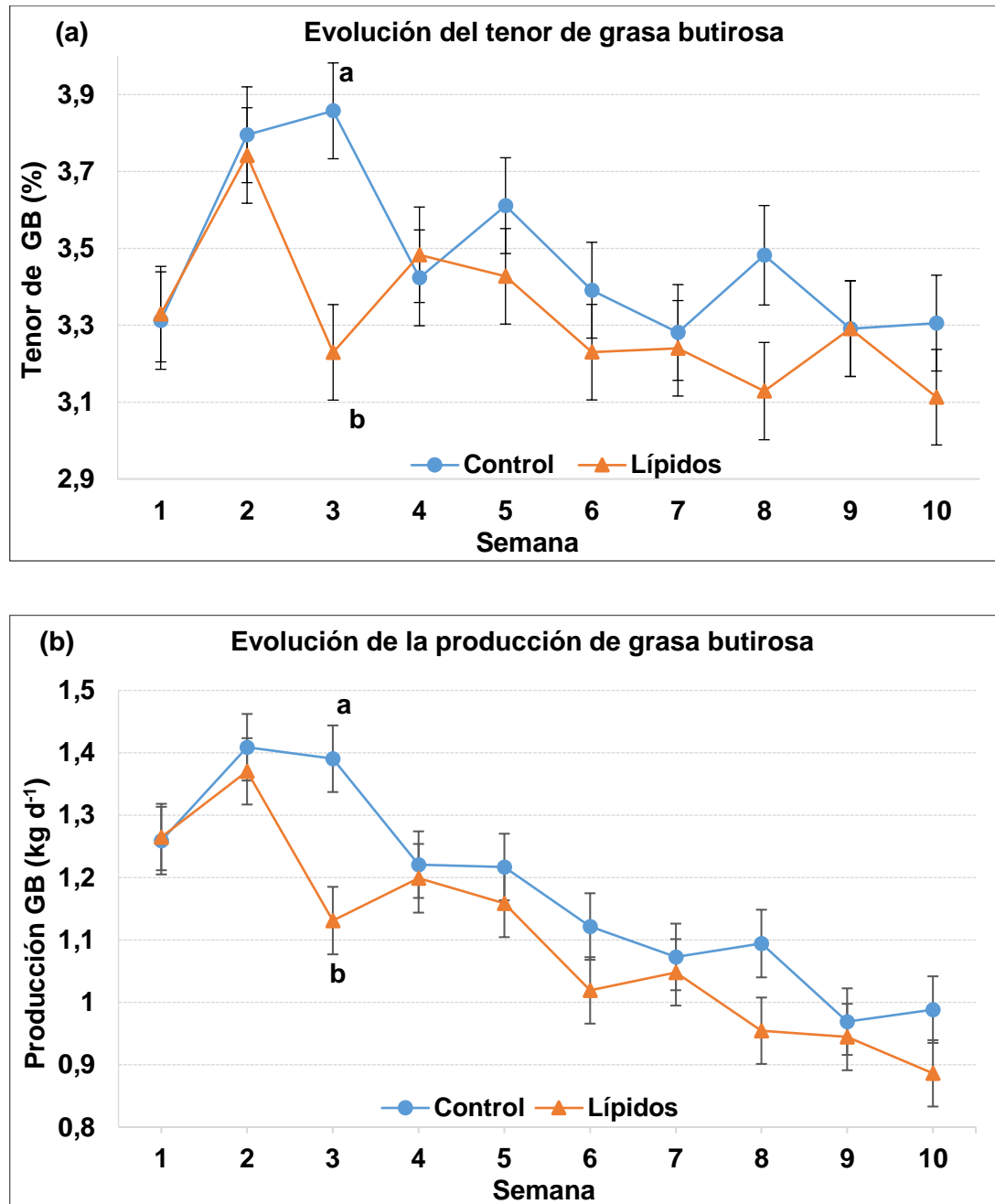


Figura 4.12 Evolución del tenor (a) de grasa butirosa (%) y la producción (b) de grasa butirosa (kg d⁻¹) en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día⁻¹).

4.6 Perfil de ácidos grasos en grasa butirosa

La suplementación con sales cálcicas de aceite de lino modificó el perfil de AG de la grasa láctea (Tabla 4.10). La suplementación con O3 redujo significativamente las concentraciones de los AG de cadena corta ($C_{5:0}$, $C_{7:0}$, $C_{9:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{13:0}$ + $cis-11 C_{12:1}$) ($P < 0,05$) con respecto al grupo control (Tabla 4.10), a excepción de las concentraciones de los AG ($C_{4:0}$, $C_{6:0}$, $C_{8:0}$) que resultaron similares entre tratamientos. La concentración de $C_{12:0}$ y de $C_{14:0}$ (pro-aterogénicos cuando se consumen en grandes cantidades) resultó menor en las vacas suplementadas con O3 ($P < 0,05$) respecto al grupo control. Los AG de cadena media ($cis-9 C_{14:1}$, $trans-9 C_{16:1}$, y $cis-9 C_{16:1}$) resultaron similares entre tratamientos, a excepción de la concentración de los AG ($C_{14:0}$, $C_{15:0}$, y $C_{16:0}$) que resultó mayor ($P < 0,05$) en las vacas del grupo control (Tabla 4.10). El consumo de las sales cálcicas de aceite de lino produjo una reducción ($P < 0,05$) de la fracción hipercolesterolémica de la leche ($C_{12:0}$, $C_{14:0}$ y $C_{16:0}$, -13,6%, - 7,4% y - 9%, respectivamente).

El aporte suplementario ($0,85 \text{ kg día}^{-1}$) de sales cálcicas de aceite de lino no modificó la concentración de ácido esteárico ($C_{18:0}$) pero incrementó significativamente la concentración de la mayoría de los AG de 18 carbonos en la grasa láctea ($P < 0,05$), a excepción de las concentraciones de los AG ($cis-11 C_{18:1}$ y $C_{18:3 n-6}$) (Tabla 4.10).

La concentración de ácido oleico ($C_{18:1 cis-9}$) resultó mayor (+ 8%, $P = 0,03$) en las vacas suplementadas con O3. La concentración de AV ($trans-11 C_{18:1}$) mostró un 34% de aumento ($P < 0,01$) en las vacas suplementadas con O3 respecto al grupo control. Del mismo modo, la concentración basal de CLA ($cis-9$, $trans-11$ CLA, AR) en la GB fue de 0,50 g/100 g AG y el consumo suplementario de las sales cálcicas de aceite de lino implicó un aumento ($P < 0,01$) en la concentración de CLA del orden del 28%, alcanzando valores de 0,64 g/100 g AG en el grupo O3.

La concentración de ALN ($C_{18:3 n-3}$) aumentó significativamente (+ 108%, $P < 0,0001$) en las vacas suplementadas con O3 en relación al grupo control. Del mismo modo, las concentraciones de los AG totales n-3 aumentaron significativamente (+100%, $P < 0,0001$) en las vacas suplementadas con O3 (Tabla 4.10).

Tabla 4.10 Concentración de ácidos grasos en la GB de vacas en lactancia temprana suplementadas (O3) o no (C) con aceite de lino protegido (0,85 kg día⁻¹).

Ácidos Grasos, g/100 g de AG	Tratamiento ¹		EEM	P-valor ²
	O3	C		Trat
C4:0	2,08	2,09	0,092	0,95
C5:0	0,02	0,02	0,001	0,02
C6:0	1,83	1,92	0,052	0,25
C7:0	0,02	0,03	0,002	0,01
C8:0	1,29	1,40	0,045	0,12
C9:0	0,03	0,04	0,004	0,02
C10:0	3,09	3,52	0,129	0,03
C10:1 + C11:0	0,33	0,38	0,018	0,07
C12:0	3,50	4,05	0,153	0,02
cis-9 C12:1	0,08	0,09	0,005	0,36
C13:0 + cis-11 C12:1	0,17	0,21	0,012	0,02
i C14:0	0,10	0,09	0,007	0,81
C14:0	11,08	11,96	0,235	0,02
i C15:0	0,25	0,24	0,009	0,45
ai C15:0	0,46	0,45	0,012	0,38
cis-9 C14:1	0,82	0,82	0,044	0,99
C15:0	0,93	1,06	0,035	0,02
i C16:0	0,23	0,22	0,013	0,61
C16:0	26,54	29,40	0,597	0,003
trans-9 16:1	0,41	0,38	0,017	0,40
cis-7 16:1	0,17	0,18	0,005	0,55
cis-9 16:1	1,41	1,53	0,053	0,13
C17:0	0,56	0,58	0,015	0,37
cis-9 C17:1	0,17	0,18	0,007	0,45
C18:0	11,52	10,75	0,450	0,25
trans-6/7/8 C18:1	0,35	0,24	0,021	0,002
trans-9 C18:1	0,24	0,18	0,015	0,002
trans-10 C18:1	0,55	0,36	0,048	0,01
trans-11 C18:1 (AV)	1,45	1,08	0,089	0,01
trans-12 C18:1	0,38	0,26	0,030	0,03
cis-9 C18:1 (oleico)	20,22	18,64	0,485	0,03
cis-11 C18:1	0,67	0,69	0,029	0,69
cis-12 C18:1	0,44	0,22	0,040	0,001
trans-16 + cis-14 C18:1	0,45	0,31	0,022	0,0003
trans-11, trans-15 C18:2	0,31	0,20	0,019	0,0007
cis-9, cis-12 C18:2 n-6	3,05	2,72	0,109	0,04
Otros C18:2	0,17	0,05	0,014	<0,0001
C18:3 n-6	0,03	0,03	0,002	0,15
C18:3 n-3	1,00	0,48	0,069	0,0001
cis-9, trans-11 CLA (AR)	0,64	0,50	0,035	0,01
Otros CLA	0,02	0,02	0,001	0,52
C20:0	0,12	0,13	0,001	0,34
C20:4 n-6	0,15	0,17	0,005	0,003

C20:5 n-3 (EPA)	0,05	0,03	0,003	0,0001
C21:0	0,04	0,02	0,003	0,0005
C22:0	0,38	0,46	0,080	0,50
C22:4 n-6	0,03	0,03	0,004	0,18
C22:5 n-3	0,07	0,05	0,002	<0,0001
C24:0	0,03	0,03	0,002	0,65
Saturados (AGS)	64,09	68,45	0,828	0,002
Monoinsaturados (AGMI)	27,80	25,24	0,632	0,01
Polinsaturados (AGPI)	5,50	4,28	0,209	0,0007
AGMI <i>trans</i> totales	3,29	2,51	0,185	0,01
n-3	1,12	0,56	0,071	<0,0001
n-6	3,25	2,95	0,107	0,06
IA ³	2,36	2,90	0,114	0,004
ID ⁴				
C14:1 cis-9/14:0	0,07	0,07	0,003	0,28
C18:1 cis-9/18:0	1,78	1,75	0,062	0,74
AR/AV	0,45	0,58	0,033	0,02
Relación n6/n3	3,04	5,54	0,204	<0,0001

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMeans (EEM). ²Efecto tratamiento. ³ÍA: índice de aterogenicidad (C12 + 4*C14 + C16)/(suma de AG insaturados). ⁴ID: índice delta-9 desaturasa. AV: ácido vaccénico. AR: ácido ruménico. n-3: AG omega-3. n-6: AG omega 6.

El índice de aterogenicidad de la leche en las vacas que recibieron la suplementación con sales cálcicas de aceite de lino fue un 18% más bajo ($P < 0,004$) con respecto al grupo de vacas control. Por otro lado, la suplementación con O3 redujo significativamente la concentración de AGS (-6 %) e incrementó significativamente las concentraciones de los AGMI (+ 10%) y AGPI (+ 28%) con respecto al grupo control (Tabla 4.10).

El aumento significativo en la concentración de los AG n-3 totales en la grasa láctea de las vacas suplementadas con O3, condujo a una reducción significativa (-45,1 %, $P < 0,0001$) de la relación n-6/n-3 en la GB del grupo O3 con respecto a al grupo control (Tabla 4.10).

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Características de la pastura y del concentrado

Acorde con nuestros resultados, las variables asociadas al valor nutritivo de la pastura permiten considerarla como de alta calidad según lo indicado por Clark y Kanneganti (1998) con valores de 18 a 24% de MS, 18 a 25% de Proteína Cruda y 40 a 50% de FDN. Los datos de composición química de la pastura muestran que el contenido de MS promedio (21%) resultó compatible con adecuados consumos de MS, ya que se ubicó por encima del rango crítico (15-18%) que afectaría el consumo (Verité y Journet, 1970). Los valores promedio de DIVMS (76%) y el tenor proteico (25%) resultaron compatibles con altos consumos de forraje (Poppi *et al.*, 1987). El coeficiente de digestibilidad de la MS del forraje, es un factor nutricional que limita el consumo en animales en pastoreo (Poppi *et al.*, 1987), existiendo una alta correlación entre el consumo y la digestibilidad del forraje cuando los valores de digestibilidad se encuentran entre 60 y 80% (Hogdson, 1977). El consumo de pastura de alfalfa objetivo fue de 6 kg MS vaca⁻¹ día⁻¹. El nivel de asignación de pastura fue el doble del consumo objetivo (Bargo *et al.*, 2003), resultando ser 12 kg MS vaca⁻¹ día⁻¹.

La digestibilidad *in vitro* de la MS (76,7%) y el tenor proteico (25,5%) de la pastura resultaron adecuados para producciones individuales superiores a 30 kg/día. El contenido de FDN promedio de la pastura (poner valor) estuvo por debajo de los valores considerados críticos (500-550 g/ kg MS⁻¹) a fin de obtener un elevado consumo de forraje y una adecuada producción de leche (Paterson *et al.*, 1994, citado por Salado, 2000). El contenido de FDN de los ingredientes de la dieta se encontró por debajo del rango propuesto por Mertens, (1994) (37-44% de FDN), como no limitante del consumo de MS para vacas que producen 20 a 30 kg de leche por día.

El contenido promedio de MS del silaje de maíz utilizado (48%) resultó superior al promedio de 31,7% encontrado en los ensilajes argentinos, mientras que el contenido de FDN (40%) fue algo inferior al 51% y el tenor proteico fue similar al promedio nacional (Schroeder *et al.*, 2000). La composición de los otros componentes constitutivos de la TMR estuvo dentro del rango de valores promedios reportados por Guaita y Fernández (2011), para alimentos para rumiantes analizados en el Laboratorio de Nutrición animal y Evaluación de Calidad de Forrajes del INTA EEA Balcarce. La TMR se caracterizó por un alto contenido de MS (67%) y de digestibilidad de la MS (69%). Los valores de PB (15%) resultaron moderados, mientras que los de FDN (31%) y los de FDA (20%) resultaron adecuados para obtener un elevado consumo. Los valores de EE (3%) fueron normales (Guaita y Fernández, 2011).

Por otra parte, la importancia de evaluar el tamaño y las características de la fibra aportada en la dieta de animales que consumen TMR radica en que un adecuado aporte de fibra efectiva permite una correcta estimulación de los procesos de rumia, masticación y producción de saliva que contribuyen a mantener adecuados valores de pH ruminal, previniendo patologías digestivas como la acidosis (aguda o subaguda) y limitaciones en la digestión de la fibra (Zebeli *et al.*, 2006). En este sentido, el contenido de peNDF_{>8} promedio de la TMR se ubicó por encima del valor mínimo requerido (18,5%) para prevenir el desarrollo de acidosis ruminal subaguda (Zebeli *et al.*, 2012).

Puede concluirse que la calidad promedio de las dietas experimentales resultó compatible con altos valores de consumo de MS y energía y no limitantes del consumo.

5.2 Consumo de pastura y concentrado

La incorporación de lípidos en las dietas provoca una disminución de la digestibilidad de la fibra, debido a posibles alteraciones en el ecosistema microbiano ruminal. Sin embargo, varios trabajos coinciden en que este riesgo es insignificante cuando el contenido de AG de las dietas no excede el 5% de la MS (Doreau y Ferlay, 2015). Los lípidos provocan una reducción en el nivel de ingestión de MS del orden de 2,6 kg MS por kg de aceites insaturados protegidos y de 1,8 kg MS por kg de grasa saturada protegida (Salado, 2000). Sin embargo, la literatura no ha sido concluyente sobre el efecto de las AG-Ca en vacas lecheras y cómo afectan la ingestión de MS. Gagliostro y Chilliard (1992), señalan que las sales cálcicas de AG parecen disminuir el consumo de MS total sólo a partir de los 0,6 kg día⁻¹ de lípidos con un alto porcentaje de efectos nulos. Por su parte, Allen (2000) modeló el efecto de las fuentes de grasa sobre el consumo de MS e informó que los AG insaturados deprimieron el consumo de MS más que los AGS. Además, sus resultados indicaron que las sales cálcicas de AG tendían a deprimir el consumo de MS. No obstante, esta depresión en el consumo de MS se observó cuando las dietas contenían concentraciones de AG superiores a lo recomendado normalmente (> 5% de la MS) (Allen, 2000).

Si bien en este estudio no se pudo determinar el efecto de la suplementación con AG-Ca de aceite de lino protegido a una ingesta diaria efectiva de 0,154 kg día⁻¹ sobre el CMS total, diversos estudios (Chouinard *et al.*, 1998; Dhiman *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2004; Gonthier *et al.*, 2005) reportan que la suplementación de hasta el 15% de la MS total utilizando semilla de lino en sus distintas presentaciones (semilla entera sin procesar, extruida, micronizada y AG-Ca), como fuente de lípidos no tuvo ningún efecto sobre el consumo de MS. En sintonía con estos trabajos, en otros estudios a corto plazo, la suplementación de hasta 15% de semilla de lino entera y extruida, en la MS de la dieta no modificó el consumo de MS de las vacas (Petit, 2010; Ferlay *et al.*, 2013).

De forma similar, en un estudio donde se suplementó con sales cálcicas de aceite de soja y aceite de lino (1% MS de la dieta) no se observaron diferencias significativas sobre el consumo de MS entre los tratamientos (Sultana *et al.*, 2008). Estudios previos (Chouinard *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1991) no encontraron efectos negativos sobre el consumo de MS donde se utilizaron sales cálcicas de AG, los cuales tenían aceptabilidad de las dietas. La cantidad de sales cálcicas de AG requerida para alcanzar la limitación del consumo dependía de las condiciones experimentales y es probablemente una función del requerimiento energético de las vacas y la cantidad de energía proporcionada por la ración basal (Chouinard *et al.*, 1998).

Allen (2000) investigó varios estudios (n = 28) que incluían el suministro de sales cálcicas de aceite de palma en las dietas de vacas lecheras y concluyó que por cada 1% de sales cálcicas de aceite de palma añadidas sobre la dieta de control, ocurría una depresión en el consumo de MS de 2,5%. En el estudio realizado por Côrtes *et al.* (2010), la adición de sales cálcicas de aceite de lino fue del 1,9% de la MS, que puede no ser lo suficientemente alta como para disminuir el consumo de MS y la digestibilidad, tal como se observó en estudios previos realizados con sales cálcicas de aceite de palma. Además, las sales cálcicas del aceite de lino y las sales cálcicas del aceite de palma pueden tener diferentes efectos sobre el consumo de alimento y la digestión.

Se han llevado a cabo experimentos en vacas lecheras, usando semillas de lino en diferentes formas y existe evidencia de que la suplementación con semilla de lino entera no tiene efecto negativo sobre el consumo de MS y sobre la función ruminal. Esta

ausencia de efectos puede ser debido a una liberación más lenta de los AG en el rumen en comparación a cuando se suplementa con fuentes fácilmente disponibles en rumen como la semilla de lino extruida o en forma de aceite (Martin *et al.*, 2008).

En este trabajo de tesis las vacas suplementadas con lípidos consumieron 2 kg MS d⁻¹ menos de concentrado en la sala de ordeño con respecto al grupo control, explicado en parte por el diseño del ensayo (concentrados isoenergéticos: las vacas del grupo control recibieron + 0,7 kg MS d⁻¹ de concentrado) y en parte por problemas de palatabilidad debido a la adición del suplemento, lo que es coincidente con lo expuesto por Grummer, (1990). Compensando entonces con un mayor consumo de MS de pastura para cubrir sus requerimientos, por lo cual el consumo de MS total resultó similar en ambos tratamientos. Al evaluar el comportamiento en pastoreo en un estudio complementario al presente referido al comportamiento ingestivo (Olmeda *et al.*, 2017), se observó que las vacas suplementadas con lípidos dedicaron significativamente más tiempo a pastoreo y menos tiempo a descanso, en sintonía con el mayor consumo de MS de pastura observado en este grupo de vacas.

Los resultados del presente trabajo de tesis coinciden con el estudio de Reis *et al.* (2012), donde suplementaron con sales cálcicas de AG instaurados a un nivel de inclusión de 1,1% base MS y no encontraron diferencias en el consumo de MS entre tratamientos, lo cual indican que la inclusión de sales de Ca de AGPI no afectó la alimentación ni el consumo de nutrientes. Asimismo, otras investigaciones han demostrado que el consumo de MS no se ve afectado en las vacas lecheras que reciben sales cálcicas de AG hasta el 5% de la dieta (Moallem *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2003; Allred *et al.*, 2006). La tasa de inclusión de las sales cálcicas de aceite de lino protegido utilizada en el presente trabajo de tesis fue de 2,8% (base MS).

Por otra parte, aunque no se midieron en este trabajo, las concentraciones plasmáticas de péptidos intestinales, tales como el péptido similar al glucagón de tipo 1 y la colecistoquinina (CCK), a menudo aumentan con suplementos de AG insaturados en comparación con los AGS (Relling y Reynolds, 2007; Bradford *et al.*, 2008; Allen, 2008). Allen (2000) indicó diferentes efectos hipofágicos de los lípidos suplementados que pueden ser distintos dependiendo de la fuente, forma y tipo de AG. Así pues, los AG insaturados podrían ser absorbidos y oxidados en el hígado más rápidamente, generando equivalentes reductores y una saciedad más rápida que los AGS (Allen, 2000). Para las vacas lecheras alimentadas con TMR, los estudios han demostrado que el efecto hipofágico del suplemento lipídico parece ser más pronunciado en los suplementos de AG insaturados que en los suplementos de AGS (Harvatine y Allen, 2006c; Relling y Reynolds, 2007), con consumos de MS disminuyendo linealmente a medida que aumenta el grado de insaturación (Pantoja *et al.*, 1994).

5.3 Variación de parámetros relacionados al peso vivo y estado corporal

Los lípidos en la dieta no parecen disminuir la pérdida de PV, CC o movilización de lípidos en vacas de lactancia temprana (Chilliard, 1993; Komaragiri *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son coincidentes con esta observación porque la suplementación con lípidos no modificó las variaciones en la CC o en el PV. El PV y la CC resultaron similares entre tratamientos coincidentes con valores similares en los niveles circulantes de Betahidroxibutirato, parámetro indicador de lipomovilización que fue determinado en un estudio complementario al presente referido a respuesta reproductiva (Iorio *et al.*, 2016).

El peso corporal promedio de las vacas mostró una ligera tendencia a incrementarse con las semanas, lo que sugiere que podrían haberse sometido a un proceso de lipogénesis, el cual ocurre en las vacas durante el período posterior al pico de lactancia cuando comienzan a restaurar el tejido graso y el peso corporal perdido durante la lactancia. Se ha postulado que la suplementación con lípidos insaturados no reduce la pérdida de peso en vacas en inicio de lactancia ni favorece la reconstitución de reservas corporales en vacas en lactancia media (Gagliostro y Chilliard, 1992).

Por su parte, los autores Weiss y Pinos-Rodríguez, (2009) no detectaron diferencias de peso entre animales suplementados con lípidos respecto a los no suplementados utilizando raciones de alto contenido de forraje, a pesar de haber registrado diferencias en condición corporal a favor de los animales suplementados.

En contraste con nuestra investigación, otros estudios reportaron, que los animales que se suplementaron con grasa protegida presentaron pérdida de CC (Calvopiña y León, 2007; González y Bas, 2002), lo que podría favorecer una mayor producción de leche (Perfield *et al.*, 2002).

5.4 Ambiente ruminal

Los suplementos de AGS son más inertes a nivel ruminal en comparación con los que tienen niveles más altos de AG insaturados (Relling y Reynolds, 2007; Rico *et al.*, 2014), similares al suplemento de aceite de lino utilizado en este trabajo de tesis. Los AG insaturados tienen un efecto asociativo negativo en la población microbiana ruminal y a su vez incrementan la cantidad de sustrato para la biohidrogenación (Lourenço *et al.*, 2010). Ante un posible efecto negativo del aporte de lípidos no protegidos adecuadamente, podrían esperarse modificaciones en la intensidad y la orientación de las fermentaciones ruminales, reduciendo la digestión de los constituyentes de la pared celular. Del mismo modo, podría esperarse un aumento en las proporciones de ácido propiónico, una disminución en la proporción de ácido acético (principal precursor de los AG sintetizados en glándula mamaria) y de ácido butírico, y una menor concentración total de AGV (Jenkins, 1993). La dosis efectiva de sales cálcicas de aceite de lino (0,154 kg día⁻¹) utilizadas en este trabajo de tesis serían suficientes para inducir modificaciones en el ambiente ruminal. Sin embargo, la concentración de AGV totales no presentó diferencias significativas entre tratamientos, al igual que las proporciones de acetato, propionato, ni la relación acetato:propionato. La ausencia de efectos sobre la fermentación a nivel ruminal en el grupo de vacas suplementadas con lípidos sugiere una protección adecuada de las sales cálcicas de AG.

Los resultados de este trabajo de tesis son consistentes con los datos de Enjalbert *et al.* (1997) quienes no observaron efecto de las sales cálcicas de aceite de palma y aceite de colza suministradas al 4% MS sobre las proporciones total e individual de AGV ruminales. Del mismo modo, Côrtes *et al.* (2010) en un estudio donde suplementaron con (base MS) 4,2% semilla de lino entera, 1,9% sales cálcicas de aceite o 2,3% semilla entera de lino + 0,8% sales cálcicas de aceite de lino, no encontraron diferencias en las concentraciones ruminales de los AGV total y las proporciones molares de acetato, isobutirato, valerato, isovalerato y ácido láctico entre tratamientos. Por otra parte, el suministro de 12,5% MS de linaza entera disminuyó la proporción molar de acetato y aumentó la de propionato, resultando en una menor proporción de acetato:propionato (Gonthier *et al.*, 2004). En el presente trabajo de tesis, las cantidades de aceite de lino suministrado fueron menores en comparación con las cantidades usadas en otros estudios donde se observaron efectos significativos sobre el ambiente ruminal (Chalupa *et al.*, 1986; Gonthier *et al.*, 2004); lo que puede explicar la falta de efectos de la suplementación con lípidos sobre la fermentación ruminal. Además, las discrepancias entre los estudios podrían deberse en parte a las diferencias en la composición de la dieta, la cantidad de sales cálcicas añadidas a la dieta o el perfil de AG del aceite suministrado. Por ejemplo, los resultados de un estudio *in vitro* (Maia *et al.*, 2007) indicaron que, aunque la sensibilidad difiere entre las especies, el crecimiento de las bacterias ruminales podría verse afectado por el tipo de AGPI, el cual podría influir directamente en la fermentación ruminal.

El pH ruminal generalmente se ve poco afectado por la suplementación con lípidos (Palmquist y Jenkins, 1980; Tamminga y Doreau, 1991), observación que resultó consistente con los resultados del presente estudio de tesis. Las sales cálcicas de AG insaturados pueden disociarse y biohidrogenarse sustancialmente cuando el pH ruminal es inferior a 6,0 (Sukhija y Palmquist, 1990). En efecto, la presencia de las sales cálcicas de aceite de lino en la ración no modificó los valores promedio de pH ruminal, resultado coincidente con los reportados por otros estudios conducidos bajo condiciones de alimentación pastoril y suplementación con lípidos saturados (Schroeder *et al.*, 2002; Salado *et al.*, 2004) o en alimentación con TMR (Chan *et al.*, 1997; Khorasani y Kennelly,

1998). Los valores de pH ruminal obtenidos estuvieron dentro de los valores considerados como óptimos para la digestión de la fibra (pH cercanos a 7).

DePeters y Cant (1992) postularon que el reemplazo de una parte del concentrado por grasa protegida en la dieta de rumiantes incrementaría la concentración de N-NH₃ en rumen debido a un aumento de la relación proteína/energía fermentecible en rumen, ya que los AG no son utilizados como fuente energética a nivel ruminal. En este trabajo de tesis, se observó una leve tendencia a una mayor concentración de N-NH₄ en las vacas suplementadas con lípidos, lo cual está en sintonía con los mayores niveles de urea circulantes en sangre (Iorio *et al.*, 2016) y de los niveles de urea en leche observados en este grupo de vacas. A pesar de que éstos son resultados de un solo muestreo, la tendencia a los mayores niveles de N-NH₄ es esperable en el grupo suplementado con lípidos debido a una menor disponibilidad de energía fermentecible en rumen. A su vez, podríamos hipotetizar que el nitrógeno disponible generado por el reemplazo isoenergético de maíz por lípidos pudo estar asociado al mayor consumo de pastura observado en este grupo de animales respecto al grupo control, con lo cual, tendrían más proteína degradable en rumen (PDR).

Previos estudios conducidos en condiciones de pastoreo indicaron ausencia de efectos significativos del aporte de lípidos protegidos sobre la concentración de N-NH₃ (Schroeder *et al.*, 2002).

En otros estudios donde suplementaron con semilla de lino entera (Petit *et al.*, 2002), laminada o extruida (Doreau *et al.*, 2009) no hubo efecto sobre las concentraciones ruminales de amoníaco y los AGV totales e individuales, asociado a una falta general de efectos sobre el consumo de MS. Los efectos negativos de la fermentación reducida incluyen la alteración de la producción de AGV y la disminución de la digestibilidad de la fibra, lo que en última instancia conduce a una disminución del consumo de MS, una disminución de la producción de leche y un bajo contenido de grasa en la leche (Theurer *et al.*, 2009). Estos efectos no fueron observados en el presente trabajo de tesis, lo cual sugiere que, aunque se pudo haber liberado parte de los AG en el líquido ruminal, los lípidos no perturbaron el ambiente ruminal y por lo tanto la protección de los mismos por saponificación fue adecuada.

5.5 Producción y Composición de leche

Los efectos de la suplementación con lípidos sobre la producción de leche han sido inconsistentes entre estudios, lo que probablemente esté asociado con la fuente de grasa utilizada (Rabiee *et al.*, 2010). Se ha hecho la observación de que la respuesta productiva a los suplementos lipídicos puede depender del nivel de producción del animal y del grado de saturación de los lípidos (Relling y Reynolds, 2007; Rico *et al.*, 2014). En este trabajo de tesis, tanto la producción de leche como la producción de LGC4% no fueron afectadas por la suplementación con sales cálcicas de aceite lino, lo cual es coincidente con el estudio de Brzóska (2006), donde la producción de leche en vacas lecheras no difirió significativamente como resultado de la suplementación con sales cálcicas de aceite de lino con una ingesta diaria de 0,31, 0,61 o 0,94 kg/día, a pesar de la mayor concentración energética de la dieta en dicho trabajo.

Por otro lado, algunos estudios señalan que no hubo un efecto consistente de las sales cálcicas de AG sobre la calidad de la leche. En este trabajo de tesis, la producción de grasa butirosa y el tenor graso fueron menores, pero no significativos en las vacas suplementadas con sales cálcicas de aceite de lino en comparación con el grupo control. Côrtes *et al.* (2010), reportó una disminución en la concentración de grasa de leche en vacas suplementadas con sales cálcicas de aceite de lino con 1,9% de MS en comparación con una dieta de control, mientras que las concentraciones de proteína, lactosa, urea y ST en la leche no fueron afectadas. De forma similar, en el estudio de Chouinard *et al.* (1998) el porcentaje de grasa de la leche disminuyó en las vacas suplementadas con las sales cálcicas comparadas con la dieta de control. Contrario a esto, Rabiee *et al.* (2012) en un meta-análisis informó que el contenido de grasa en la leche aumentó con sales cálcicas y comprimidos de aceite de palma, pero que podría reducirse con otras fuentes de sales cálcicas de AG. Los diferentes resultados sobre el efecto de las sales cálcicas de AG sobre el contenido de grasa de la leche sugirieron que el efecto estaba influenciado por diferentes fuentes y niveles de inclusión de las sales cálcicas en la ración.

En cuanto al contenido de proteína en leche obtenidos en esta tesis, no se observaron reducciones significativas con la suplementación de sales cálcicas de aceite de lino, lo cual está en sintonía con el estudio de Rabiee *et al.* (2012). Contrario a nuestros resultados, otros autores han demostrado que la proteína láctea disminuye en vacas que reciben sales cálcicas de AG (Erickson *et al.*, 1992; Harrison *et al.*, 1995; Chouinard *et al.*, 1997). Sin embargo, se registró un mayor contenido de urea en leche en las vacas suplementadas, lo que es coincidente con los niveles circulantes de urea en rumen y en sangre de este mismo ensayo (Iorio *et al.*, 2016); este resultado podría explicarse por una menor disponibilidad de energía fermentecible en rumen para que las bacterias aprovechen el nitrógeno disponible generado por el reemplazo isoenergético de maíz por lípidos. A su vez, podríamos hipotetizar que el nitrógeno disponible pudo ser mayor en las vacas que fueron suplementadas con el tratamiento de O3 debido a que éstas presentaron un mayor consumo de pastura, por ende, habrían tenido una mayor ingesta de PDR. La ausencia de efectos entre los tratamientos en cuanto al porcentaje de grasa butirosa y proteína en la leche podría indicar que las dietas formuladas aportaron al rumen la cantidad suficiente de nutrientes para una actividad fermentativa ruminal normal y que la inclusión de grasas protegidas omega-3 a una dosis de hasta 0,85 kg día⁻¹ no manifestó problemas ruminales que pudieran haber alterado la síntesis láctea lo cual es consistente con los valores de pH encontrados (pH > 6).

Los resultados obtenidos de esta tesis estuvieron acordes con estudios donde no se encontraron efectos significativos en producción de leche, porcentaje de grasa y proteína

cuando se suplementó los animales con jabones cálcicos de AG omega-3 (Heravi *et al.*, 2007; Kitessa *et al.*, 2004). Según Onetti y Grummer (2004), existe una interacción entre la etapa de lactancia y la cantidad de lípidos suplementarios, con la suplementación con lípidos aumentando la producción de leche de vacas lecheras en lactancia temprana, pero no de vacas en lactancia media, donde se produjo una depresión de la grasa de la leche (Petit, 2010). Contrario a lo encontrado en este trabajo de tesis, algunos estudios muestran que hay un efecto de las grasas insaturadas en la producción de grasa láctea de animales en pastoreo, explicado por una disminución en la concentración de grasa en leche y por un aumento en la producción de leche (Schroeder *et al.*, 2003). Esto se atribuye a un efecto directo de intermediarios de AG formados en rumen durante la biohidrogenación, que causan disminución en la síntesis *de novo* de los AG en glándula mamaria cuando las grasas no están bien protegidas o cuando su inclusión en la dieta excede el 8% en la dieta (Doreau y Chilliard, 1997; Harvatine y Allen, 2006c). En general, algunos autores sustentan que la suplementación con grasa de la dieta parece aumentar la producción sin afectar la composición de la leche de vacas alimentadas con pastos de alta calidad. Estos aumentos en la producción de leche pueden estar relacionados con una mejor utilización de la energía en lugar de un aumento de la ingestión energética. Los autores sugieren que el ahorro en la utilización de la glucosa podría ser, al menos parcialmente, el causante de este resultado, ya que al administrar una dieta suplementada con grasa, los AG resultan ser una fuente de energía para los tejidos, así como para la síntesis de triglicéridos en glándula mamaria (González y Bas, 2002; Schroeder *et al.*, 2004b).

5.6 Perfil de ácidos grasos en leche

La respuesta de la composición de AG de la leche integra tanto el metabolismo del rumen (hidrólisis y biohidrogenación de AG de la dieta, determinación del flujo y composición duodenal de AG) como el metabolismo de la vaca (movilización de lípidos, captación mamaria de AG del plasma, síntesis mamaria de AG *de novo*; Chilliard *et al.*, 2000; Chilliard *et al.*, 2007).

En este trabajo de investigación, con la adición de sales cálcicas en la dieta no hubo evidencia suficiente de su efecto sobre los AG de cadena corta (C_{4:0}, C_{6:0} y C_{8:0}); así mismo, Chilliard y Ferlay (2004), sugieren que la concentración de AG de cadena corta (C_{4:0}, C_{6:0} y C_{8:0}) generalmente no cambia o se ve poco afectada cuando se practica este tipo de suplementación con AGPI. Estos AGS sintetizados *de novo* en la glándula mamaria (C_{4:0} a C_{8:0}) no son indispensables para el hombre y tampoco resultan aterogénicos, ya que representan una fuente de energía rápidamente oxidable para el organismo (Navarro, 2017). El consumo de AGS de 4 a 10 átomos de carbono no conduce a elevaciones en el colesterol sérico (Ulbricht y Southgate, 1991) ni estaría asociado a riesgos de muerte por afecciones coronarias (Hu *et al.*, 1999).

Por otra parte, hubo evidencia sobre una reducción en la concentración de AG de cadena media (C_{14:0}-C_{16:0}) en la grasa de la leche y un incremento de los AG de cadena larga (C_{18:0}-C_{20:0}), resultados coincidentes con los estudios de Fuentes Álvarez (2009) y Côrtes *et al.* (2010). Esta reducción de la fracción hipercolesterolémica de la leche (C_{12:0}, C_{14:0} y C_{16:0}) en las vacas suplementadas con sales cálcicas de aceite de lino en sistema pastoril a diferencia de otros estudios que han utilizado dietas TMR, concuerdan con un meta-análisis de Glasser *et al.* (2008), donde se demostró que la inclusión de lino en la dieta reduce la concentración de AG de cadena media (C_{12:0} a C_{14:0}) y C_{16:0}, mientras la concentración de AGMI y AGPI de cadena larga aumentan. El consumo de estos AGS (láurico (C_{12:0}), mirístico (C_{14:0}) y palmítico (C_{16:0}) resultan ser perjudiciales porque aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Marín *et al.*, 2013) e incrementan la concentración total del colesterol plasmático (LDL) (Schrezenmeir y Jagla, 2000). La reducción de la concentración de estos AGS en la grasa láctea por la inclusión de suplementos ricos en AGPI es un efecto documentado por varios autores tales como AbuGhazaleh y Jenkins (2004); Zheng *et al.* (2005); Huang *et al.* (2008), y Jenkins (2004), quienes sugieren que la suplementación con fuentes ricas en AGPI inhibe fuertemente la enzima acetil-coA carboxilasa y la síntesis *de novo* de AG en los tejidos de la glándula mamaria, porque al menos los AG de la leche C_{4:0} - C_{14:0} y aproximadamente la mitad de C_{16:0} son sintetizados *de novo* por las células epiteliales mamarias (Thanh y Suksombat, 2015). Es decir, que la actividad de las enzimas responsables de la síntesis *de novo* podría inhibirse por el aumento de la disponibilidad de AG de cadena larga para la ubre debido a su mayor absorción en el intestino (Chilliard y Ferlay, 2004).

En particular, en esta investigación, la disminución de los contenidos de C_{14:0} y C_{16:0} en la leche de vacas suplementadas con O3 puede ser un objetivo positivo desde la perspectiva de la salud humana, porque altas concentraciones de C_{14:0} y C_{16:0} se han asociado con problemas cardiovasculares (Noakes *et al.*, 1996). Como se ha mostrado, la leche de las vacas que recibieron la inclusión de aceite rico en AGPI reveló una mejora en la proporción de AG insaturados y una disminución en la proporción de AGS, resultados consistentes con estudios previos realizados por Caroprese *et al.* (2010), Lerch *et al.* (2012), y Neveu *et al.* (2014).

Así pues, se puede deducir que el suministro en la dieta de AG insaturados de cadena larga mejora su secreción en la grasa láctea y disminuye la síntesis *de novo* de AG de cadena corta y media en la glándula mamaria (Grummer, 1991), y es probable que la parte disminuida en la síntesis endógena de AG en la glándula mamaria, cuando se suplementa con AG insaturados, está relacionada con una mayor formación de intermediarios específicos de la biohidrogenación en el rumen (Thanh y Suksombat, 2015). Además, en el meta-análisis realizado por (Glasser *et al.*, 2008), todos los AG del C_{6:0} a C_{16:0} se redujeron con la suplementación de AG, de acuerdo con el papel inhibitor de varios isómeros *trans*-C_{18:0} producidos en el rumen en la síntesis *de novo* AG (Bauman y Griinari, 2001; Shingfield y Griinari, 2007) y quizás directamente por los AGPI de la dieta (Chilliard *et al.*, 1991).

Al igual que en el trabajo de Brzóska (2006), los resultados de nuestro estudio han demostrado que suplementar sales cálcicas de AG a vacas lecheras aumenta significativamente el contenido de AGPI de la leche. Otro hallazgo encontrado fue el aumento significativo del ácido oleico (C_{18:1}) en la leche de las vacas suplementadas con O3. El ácido oleico de la grasa láctea puede tener dos orígenes: 1) ácido oleico preformado procedente de la dieta o de la grasa corporal movilizada y captado de la sangre por la glándula mamaria, y 2) ácido oleico formado en la ubre por la acción de la enzima delta-9 desaturasa sobre el ácido esteárico (18:0), procedente a su vez de la movilización de reservas grasas o de la biohidrogenación ruminal de los AG insaturados de 18 átomos de carbonos de la dieta (Martínez *et al.*, 2010). Otra teoría podría ser que el aumento de C_{18:1} pudiera ser el resultado de la biohidrogenación parcial de los AG C_{18:2} y C_{18:3} con producción de ácido vaccénico (AV, *trans*-11 C_{18:1}), lo que explicaría el aumento en la concentración del ácido ruménico (AR, *cis*-9 *trans*-11 CLA) en la leche, y de la desaturación de C_{18:0} en la glándula mamaria (Kennelly, 1996).

El efecto de los aceites y semillas ricos en AL (C_{18:2} n-6) o ALN (C_{18:3} n-3) sobre el contenido de ácido oleico de la grasa láctea depende de la eficacia de la biohidrogenación, que aumenta con el contenido de forraje de la dieta (Martínez, 2010). El aumento de la proporción de forraje de la dieta permite una biohidrogenación más completa de los AGPI, aumentando la disponibilidad de ácido esteárico para la enzima delta-9 desaturasa mamaria, lo que resulta en un aumento del contenido de ácido oleico en la grasa láctea (Martínez *et al.*, 2013).

Así mismo, en esta investigación, se determinó que la suplementación con sales cálcicas de aceite de lino produjo un incremento sobre otros intermediarios de la biohidrogenación ruminal (*trans*-9 C_{18:1}, *trans*-10 C_{18:1}, *trans*-12 C_{18:1}) y las concentraciones del AR en la grasa de la leche comparada con el grupo control, siendo estos resultados consistentes con los de Fuentes (2009), lo que podría sugerir que hubo liberación de las sales cálcicas de aceite de lino en rumen. A valores de pH ruminal comprendidos entre 5,5 y 6,0 resulta esperable una disociación teórica del orden del 40% en sales cálcicas de AGPI, calculado a partir de los valores de pKa (Sukhija y Palmquist 1990). Este resultado es consistente con la protección parcial de las sales cálcicas de AG contra la biohidrogenación ruminal informada por Ferlay *et al.* (1992). De manera similar, se observaron altas concentraciones de AG *trans*-9 y del AV (*trans*-11 C_{18:1}) en la grasa láctea de vacas suplementadas con tres sales cálcicas diferentes de aceite de canola, aceite de lino y aceite de soja en comparación con las vacas suplementadas con una dieta control (Chouinard *et al.*, 1998). Estos resultados son similares a los de Côrtes *et al.* (2010), quienes también reportaron altas concentraciones de los productos intermediarios de la biohidrogenación ruminal, incluyendo el AR (*cis*-9 *trans*-11 CLA) en las vacas suplementadas con sales cálcicas de aceite de lino (1,9% de MS en la dieta), en

comparación con una dieta conteniendo 4,2% MS de semilla de lino entera, y sugieren que la biohidrogenación de los AGPI probablemente fue menos completa cuando el aceite de lino se suministró en forma de sales cálcicas que cuando se suministró como semilla entera.

De forma similar, en el estudio realizado por Dhiman *et al.* (2000) utilizando aceite de lino al 2% y 4% de la MS de la dieta, se concluye que la concentración de AR (*cis*-9, *trans*-11 CLA) en la leche aumentó 305% y 328%, respectivamente, para las dos concentraciones de aceite de lino en la dieta en comparación con las vacas que no recibieron aceite de lino. Sin embargo, cuando se incluyó aceite de lino al 1%, la concentración de AR (*cis*-9, *trans*-11 CLA) en leche de las vacas, no difirió de las vacas del grupo control. En cambio en el trabajo de Fuentes (2009), las vacas recibieron una dieta con un equivalente de 2,1% de aceite de lino, y esto fue suficiente para aumentar la concentración de AR (*cis*-9, *trans*-11 CLA) en la leche aproximadamente un 46%.

Por el contrario, en nuestro trabajo de investigación, el aumento de la concentración del AR (*cis*-9, *trans*-11 CLA) en las vacas suplementadas con O3, no es coincidente con los resultados de Brzóška (2006), quien reportó concentraciones similares entre las vacas que fueron suplementadas con sales cálcicas de aceite de lino de 0 a 5,4% de la MS de la dieta. Las diferencias entre el estudio de Brzóška (2006) y nuestro estudio podrían estar relacionado con un nivel diferente de protección contra la biohidrogenación ruminal entre las sales cálcicas y con la dieta base.

Acorde con nuestros hallazgos, Caroprese *et al.* (2010) reportan que el aumento en el consumo de ALN (C_{18:3-3}) en la dieta en vacas suplementadas con semilla de lino entera y aceite de pescado micro-encapsulado respecto al grupo control, presentaron mayores niveles de AV (*trans*-11 C_{18:1}) y un aumento del AR (*cis*-9, *trans*-11 CLA) por la actividad de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa.

Por otro lado, los resultados del estudio muestran que las concentraciones de AG n-3 tuvieron un aumento significativo en la leche de 0,56 a 1,12 g/100 g AG en las vacas suplementadas con O3 en comparación con las alimentadas con la dieta control. La concentración de C_{18:3 n-3} en la grasa de la leche se incrementó en mayor medida con la inclusión de las sales cálcicas de aceite de lino. Este incremento fue de 0,48 a 1,00 g/100 g AG para la dosis de 0,85 kg día⁻¹. Resultados similares se comparan con el estudio de Aii *et al.* (1991), donde suplementaron a vacas lecheras con sales cálcicas de aceite de lino (0 a 500 g/ día), y encontraron que el nivel de ALN (C_{18:3 n-3}) en la leche aumentó de 0,49% a 1,95%. También concluyeron que, en condiciones de alimentación sin la suplementación de lípidos, el nivel de ALN (C_{18:3 n-3}) en la leche de vaca es de aproximadamente 0,4-0,5%, mientras que la proporción de ácido transferido a la leche de la dieta que contiene sales cálcicas de aceite de lino es de alrededor del 5%.

Otro hallazgo encontrado en el estudio fue que la relación AG n-6/n-3 en la grasa láctea fue significativamente menor en las vacas suplementadas con las sales cálcicas de aceite de lino, lo cual es consistente con los resultados de Caroprese *et al.* (2010), donde la relación AG n-6/n-3 fue menor en vacas suplementadas con semilla de lino entera y aceite de pescado micro-encapsulado, en comparación con los animales de la dieta control. Del mismo modo, Fuentes y Calsamiglia (2009), reportaron que la suplementación con sales cálcicas de aceite de lino dio una relación AG n-6/n-3 menor a 5:1 en la leche en comparación con el control. Esto concuerda con Petit (2002), quien informó una disminución de la proporción de AG n-6/ n-3 cuando las vacas fueron suplementadas con semilla de lino entera, en comparación con los jabones cálcicos de aceite de palma. Esta reducción en la relación n-6/n-3 en la grasa de la leche se ubica

dentro de los rangos saludables de la dieta ($< 4:1$), lo que podría mejorar el valor nutritivo de leche desde la perspectiva de la salud humana.

El índice aterogénico, en el presente estudio tuvo una disminución en la leche de las vacas suplementadas con O3 de 18%. Las ecuaciones propuestas por Ulbricht y Southgate (1991) para los índices aterogénicos y trombogénicos mostraron que los AG $C_{12:0}$, $C_{14:0}$ y $C_{16:0}$ son aterogénicos, mientras que $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ y $C_{18:0}$ son trombogénicos. Los AGPI n-3, los AGPI n-6 y los AGMI son antiaterogénicos y antitrombogénicos. También la suplementación de mezclas de aceites ricos en AGPI en el estudio realizado por Thanh y Suksombat (2015) dio como resultado la reducción de la relación del índice aterogénico y la relación de AG n-6/n-3, que puede contrarrestar el efecto perjudicial del alto contenido de AGS y AG n-6 en la leche.

Con estos hallazgos se confirma la hipótesis de este trabajo de investigación, donde la suplementación con sales cálcicas de aceite de lino mejoró la calidad nutracéutica de la leche, debido a que la protección de los lípidos contra la digestión ruminal permitió una mayor transferencia del ALN ($C_{18:3 \text{ n-3}}$) contenido en el aceite de lino a la glándula mamaria. La leche de las vacas suplementadas con O3 junto con el alto contenido de CLA se caracterizó por tener bajos índices aterogénicos, sugiriendo que su utilización tiene menos efectos perjudiciales sobre la aterosclerosis y el riesgo de trombosis coronaria asociados con el consumo de leche y productos lácteos, siendo potencialmente más saludable para los humanos.

CAPÍTULO 6
CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones Generales

- La suplementación con lípidos protegidos bajo la forma de sales cálcicas de aceite de lino a vacas lecheras en primer tercio de lactancia alimentadas con raciones parcialmente mezcladas no produjo efectos sobre la producción y composición de leche, y los parámetros asociados a la variación de reservas corporales.
- La ausencia de efectos negativos de los lípidos sobre el tenor graso de la leche y la fermentación ruminal sugieren que la protección por saponificación resultó efectiva.
- El consumo de $0,154 \text{ kg día}^{-1}$ de sales cálcicas de aceite de lino mejoró el valor saludable de la leche. En efecto, el suplemento lipídico utilizado resultó eficaz para disminuir la fracción hipercolesterolémica de la leche y su índice de aterogenicidad, incrementando la concentración de ácido vaccénico y ácido ruménico sobre los niveles basales. A su vez, incrementó la concentración de ALN ($\text{C}_{18:3 \text{ n-3}}$) y de AG n-3 totales y redujo significativamente la relación n-6/n-3 disminuyendo así el riesgo potencial de enfermedades coronarias.

6.2 Implicancias

- Determinar otro ensayo (**Dosis-Respuesta**), para así conocer el umbral a la cual obtendríamos una respuesta del animal a la suplementación de los lípidos.
- Probar otras técnicas y/o **tecnologías de protección** de los lípidos.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- AbuGhazaleh, A. A., & Holmes, L. D. (2007). Diet supplementation with fish oil and sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2897–2904.
- AbuGhazaleh, A. A., & Jenkins, T. C. (2004). Disappearance of docosaehaenoic and eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 645–651.
- AbuGhazaleh, A. A., Schingoethe, D. J., Hippen, A. R., & Kalscheur, K. F. (2004). Conjugated linoleic acid increases in milk when cows fed fish meal and extruded soybeans for an extended period of time. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1758–1766.
- Aii, T. (1991). Increase in α -linolenic acid in milk fat by feeding the calcium soap of fatty acids prepared from linseed oil. *Anim. Sci. Technol.(Jap.)*, 62, 58-62.
- Allen, M. S. (2000). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1598–1624.
- Allred, S. L., Dhiman, T. R., Brennand, C. P., Khanal, R. C., McMahon, D. J., & Luchini, N. D. (2006). Milk and cheese from cows fed calcium salts of palm and fish oil alone or in combination with soybean products. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 234–248.
- Angulo, J., Mahecha, L., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Dannenberger, D., Olivera, M., Bernard, L. (2012). Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. *Animal*, 6(12), 1961–1972.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1990). Official Methods of Analysis. 16th ed. AOAC, Washington, DC, USA.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1998). Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Armstrong, F. B., & Bennett, T. P. (1982). *Bioquímica*. Reverte.
- Ashes, J. R., Gulati, S. K., & Scott, T. W. (1997). Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *Journal of Dairy Science*, 80(9), 2204–2212.
- Avila, C. D., DePeters, E. J., Perez-Monti, H., Taylor, S. J., & Zinn, R. A. (2000). Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1505–1519.
- Barber, M. C., Clegg, R. A., Travers, M. T., & Vernon, R. G. (1997). Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1347(2–3), 101–126.
- Bargo, F., L. D. Muller, J. E. Delahoy, and T. W. Cassidy. (2002). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, 85:2948–2963.
- Bargo, F. (2003). Suplementación en pastoreo: Conclusiones sobre las últimas experiencias en el mundo. *Suplementación En Pastoreo: Conclusiones Sobre Las Últimas Experiencias En El Mundo*. Retrieved from <http://www.agro.uba.ar/sites/default/files/catedras/bargo.pdf>
- Bas, P., Archimède, H., Rouzeau, A., & Sauvant, D. (2003). Fatty acid composition of mixed-rumen bacteria: effect of concentration and type of forage. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2940–2948.
- Bargo, F., Muller, L. D., Kolver, E. S., & Delahoy, J. E. (2003). Invited review: production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 1-42.

- Baudracco, J., Comeron, E.A., Lopez-Villalobos, N., Romero, L.A. y Scandolo, D. (2013). Effects of herbage allowance on dry matter intake, efficiency of grazing, milk yield and grazing behaviour of crossbred holstein-jersey dairy cows grazing alfalfa pastures. *Advances in Dairy Research* 2:109.
- Bauman, D. E., Corl, B. A., & Peterson, D. G. (2003). The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, 2, 146–173.
- Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2001a). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 70(1), 15–29.
- Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 23(1), 203–227.
- Bauman, D. E., Lock, A. L., & others. (2006). Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows. In *Proceedings, Tri-State Nutr. Conf., Ft. Wayne, IN*.
- Bauman, D. E., Perfield, J. W., Harvatine, K. J., & Baumgard, L. H. (2008). Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. *The Journal of Nutrition*, 138(2), 403–409.
- Beam, T. M., Jenkins, T. C., Moate, P. J., Kohn, R. A., & Palmquist, D. L. (2000). Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2564–2573.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Benchaar, C., & Holtshausen, L. (2009). Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 2118–2127.
- Belury, M. A. (2002). *The Journal of Nutrition*, 132(10), 2995–2998.
- Benchaar, C., McAllister, T. A., Petit, H. V., & Chouinard, P. Y. (2014). Whole flax seed and flax oil supplementation of dairy cows fed high-forage or high-concentrate diets: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations and milk fatty acid profile. *Animal Feed Science and Technology*, 198, 117–129.
- Benito, P., Caballero, J., Moreno, J., Gutiérrez-Alcántara, C., Muñoz, C., Rojo, G., Soriguer, F. C. (2006). Effects of milk enriched with ω -3 fatty acid, oleic acid and folic acid in patients with metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*, 25(4), 581–587.
- Benjamin, S., & Spener, F. (2009). Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition & Metabolism*, 6(1), 36.
- Bernard, L., Rouel, J., Leroux, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Legrand, P., & Chilliard, Y. (2005). Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids. *Journal of Dairy Science*, 88(4), 1478–1489.
- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., & Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(12), 789–810.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., & Fievez, V. (2008). Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4714–4727.
- Bradford, B. J., Harvatine, K. J., & Allen, M. S. (2008). Dietary unsaturated fatty acids increase plasma glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin and may decrease premeal ghrelin in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1443–1450.
- Brown, J. M. (2003). Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR signaling by CLA in human preadipocytes. *The Journal of Lipid Research*, 44(7), 1287–1300.

- Brown, J. M., & McIntosh, M. K. (2003). Conjugated Linoleic Acid in Humans: Regulation of Adiposity and Insulin Sensitivity. *The Journal of Nutrition*, 133(10), 3041–3046.
- Brzóska, F. (2006). Effect of fatty acid calcium salts from linseed oil on the yield and n-3 fatty acid content of milk and on blood plasma parameters of cows. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15(3), 347.
- Brzóska, F., Gąsior, R., Sala, K., & Zyzak, W. (1999). Effect of linseed oil fatty acid calcium salts and vitamin E on milk yield and composition. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 8(3), 367–378.
- Burdge, G. C., & Calder, P. C. (2006). Dietary α -linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutrition Research Reviews*, 19(01), 26.
- Calder, P. C. (2006). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75(3), 197–202.
- Calder, P. C. (2013). n-3 Fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(03), 326–336.
- Calder, P. C. (2014). Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(10), 1280–1300.
- Calder, P. C., Ahluwalia, N., Albers, R., Bosco, N., Bourdet-Sicard, R., Haller, D., Zhao, J. (2013). A Consideration of Biomarkers to be Used for Evaluation of Inflammation in Human Nutritional Studies. *British Journal of Nutrition*, 109(S1), S1–S34.
- Calder, P. C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K., Winklhofer-Roob, B. M. (2011). Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition*, 106(S3), S5–S78.
- Calder, P. C., Albers, R., Antoine, J.-M., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G. A., Zhao, J. (2009). Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101(S1).
- Calder, P. C., & Yaqoob, P. (2009). Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgraduate Medicine*, 121(6), 148–157.
- Calvopiña, A. I., & León, V. (2007). Estudio de la suplementación de tres niveles de grasa sobrepasante en la alimentación de vacas lactantes Holstein Friesian. *Rumipamba*, 21(1), 1–12.
- Caroprese, M., Marzano, A., Marino, R., Gliatta, G., Muscio, A., & Sevi, A. (2010). Flaxseed supplementation improves fatty acid profile of cow milk. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2580–2588.
- Chalupa, W., Vecchiarelli, B., Elser, A. E., Kronfeld, D. S., Sklan, D., & Palmquist, D. L. (1986). Ruminant fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids¹. *Journal of Dairy Science*, 69(5), 1293–1301.
- Chen, S.-C., Lin, Y.-H., Huang, H.-P., Hsu, W.-L., Houn, J.-Y., & Huang, C.-K. (2012). Effect of conjugated linoleic acid supplementation on weight loss and body fat composition in a Chinese population. *Nutrition*, 28(5), 559–565.
- Chilliard, Y. (1993). Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3897–3931.
- Chilliard, Y., & Ferlay, A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44(5), 467–492.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R. M., & Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de zootechnie* (Vol. 49, pp. 181–205).

- Chilliard, Y., Gagliostro, G., Flechet, J., Lefaivre, J., & Sebastian, I. (1991). Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 5. Milk fatty acids and adipose tissue lipogenic activities. *Journal of Dairy Science*, 74(6), 1844–1854.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., & Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 828–855.
- Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., & Doreau, M. (2009). Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 5199–5211.
- Choi, B., & Palmquist, D. (1996). High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. *The Journal of Nutrition*, 126(11), 2913–2919.
- Chouinard, P. Y., Girard, V., & Brisson, G. J. (1997). Lactational response of cows to different concentrations of calcium salts of canola oil fatty acids with or without bicarbonates. *Journal of Dairy Science*, 80(6), 1185–1193.
- Chouinard, P. Y., Girard, V., & Brisson, G. J. (1998). Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. *Journal of Dairy Science*, 81(2), 471–481.
- Clark, D. A., & Kanneganti, V. R. (1998). Grazing management systems for dairy cattle. *Grass for dairy cattle*, 6.
- Collomb, M., Sollberger, H., Bütikofer, U., Sieber, R., Stoll, W., & Schaeren, W. (2004). Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *International Dairy Journal*, 14(6), 549–559.
- Comeron, E., Romero, L., Peyraud, J.L., Bruno, O. and Delaby, L. (1995). Effects of herbage allowance on performances of dairy cows grazing alfalfa swards. *Annales de zootechnie*, 44, 368.
- Coppa, M., Ferlay, A., Chassaing, C., Agabriel, C., Glasser, F., Chilliard, Y., Martin, B. (2013). Prediction of bulk milk fatty acid composition based on farming practices collected through on-farm surveys. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4197–4211.
- Côrtes, C., da Silva-Kazama, D. c., Kazama, R., Gagnon, N., Benchaar, C., Santos, G. T. D., Petit, H. V. (2010). Milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows fed whole flaxseed and calcium salts of flaxseed oil. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 3146–3157.
- Craninx, M., Steen, A., Van Laar, H., Van Nespen, T., Martín-Tereso, J., de Baets, B., & Fievez, V. (2008). Effect of lactation stage on the odd- and branched-chain milk fatty acids of dairy cattle under grazing and indoor conditions. *Journal of Dairy Science*, 91(7), 2662–2677.
- Dannenberger, D., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Scollan, N., Steinhart, H., & Ender, K. (2005). Effect of pasture vs. concentrate diet on CLA isomer distribution in different tissue lipids of beef cattle. *Lipids*, 40(6), 589–598.
- Demeyer, D., & Doreau, M. (1999). Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(03), 593–607.
- DePeters, E. J., & Cant, J. P. (1992). Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *Journal of Dairy Science*, 75(8), 2043–2070.
- Dewhurst, R. J., Shingfield, K. J., Lee, M. R. F., & Scollan, N. D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3–4), 168–206.

- Dhiman, T. R., Nam, S.-H., & Ure, A. L. (2005). Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), 463–482.
- Dhiman, T. R., Satter, L. D., Pariza, M. W., Galli, M. P., Albright, K., & Tolosa, M. X. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *Journal of Dairy Science*, 83(5), 1016–1027.
- Doreau, M., & Chilliard, Y. (1997). Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *British Journal of Nutrition*, 78(1), S15–S35.
- Doreau, M., & Ferlay, A. (1994). Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45(3–4), 379–396.
- Doreau, M., & Ferlay, A. (2015). Linseed: a valuable feedstuff for ruminants. *OCL*, 22(6), D611.
- Doreau, M., Laverroux, S., Normand, J., Chesneau, G., & Glasser, F. (2009). Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids*, 44(1), 53–62.
- dos Santos, V.L.F.; Ferreira, M.A.; dos Santos, G.T.; Damasceno, J.C.; Oliveira, K; Agostino, B.C.; Olivo, P.M.; Soares, L.F.P. y Silva, J.L. (2015). Cassava peel as a replacement for corn in the diet of lactating cows. *Tropical Animal Health and Production*, 47: 779–781.
- Drackley, J. K., Cicela, T. M., & LaCount, D. W. (2003). Responses of primiparous and multiparous Holstein cows to additional energy from fat or concentrate during summer. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1306–1314.
- Dunstan, J. A., Mitoulas, L. R., Dixon, G., Doherty, D. A., Hartmann, P. E., Simmer, K., & Prescott, S. L. (2007). The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial. *Pediatric Research*, 62(6), 689–694.
- Elgersma, A., Tamminga, S., & Ellen, G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3–4), 207–225.
- Enjalbert, F. (1995). Les lipides dans l'alimentation de la vache laitière. Incidences sur le métabolisme mammaire et la qualité du lait. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 146(7): 453-460.
- Enjalbert, F., Nicot, M. C., Bayourthe, C., Vernay, M., & Moncoulon, R. (1997). Effects of dietary calcium soaps of unsaturated fatty acids on digestion, milk composition and physical properties of butter. *Journal of Dairy Research*, 64(2), 181–195.
- Erickson, P. S., Murphy, M. R., & Clark, J. H. (1992). Supplementation of dairy cow diets with calcium salts of long-chain fatty acids and nicotinic acid in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 75(4), 1078–1089.
- Fahey, J., Mee, J. F., O'Callaghan, D., & Murphy, J. J. (2002, February). Effect of calcium salts of fatty acids and calcium salt of methionine hydroxy analogue on reproductive responses and milk production in Holstein-Friesian cows.
- FAO/OMS. (1997). Capítulo 2 - Composición de las grasas alimentarias. Disponible en: May 23, 2017, <http://www.fao.org/docrep/V4700S/v4700s06.htm#cap%C3%ADtulo%20%20%20composici%C3%B3n%20de%20las%20grasas%20alimentarias>
- Ferlay, A., Agabriel, C., Sibra, C., Journal, C., Martin, B., & Chilliard, Y. (2008). Tanker milk variability in fatty acids according to farm feeding and husbandry practices in a French semi-mountain area. *Dairy Science and Technology*, 88(2), 193–215.
- Ferlay, A., Chilliard, Y., & Doreau, M. (1992). Effects of calcium salts differing in fatty acid composition on duodenal and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(1), 31–37.

- Ferlay, A., Doreau, M., Martin, C., & Chilliard, Y. (2013). Effects of incremental amounts of extruded linseed on the milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn silage. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6577–6595.
- Ferrante, D., & Virgolini, M. (2007). Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2005: resultados principales: Prevalencia de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares en la Argentina. *Revista Argentina de Cardiología*, 75(1), 20–29.
- Field, C. J., Blewett, H. H., Proctor, S., & Vine, D. (2009). Human health benefits of vaccenic acid. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34(5), 979–991.
- Franco, S. L., de Souza, S. O., Pereira, M. M. S., & Barroso, D. S. (2014). Correlation between ingestive behaviour, intake and performance of grazing cattle supplemented with or without propolis extract (LLOS®). *Journal of Agricultural and Crop Research*, 2(1), 1-10.
- Freeman, M. P., Hibbeln, J. R., Wisner, K. L., Davis, J. M., Mischoulon, D., Peet, M., Stoll, A. L. (2006). Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 67(12), 1954–1967.
- Friggens, N. C., Oldham, J. D., Dewhurst, R. J., & Horgan, G. (1998). Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *Journal of dairy science*, 81(5), 1331–1344.
- Fuentes Álvarez, M. C. (2009). *Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche a través de la manipulación nutricional en vacas lecheras: el papel del rumen*.
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Sánchez, C., González, A., Newbold, J. R., Santos, J. E. P., ... Fontecha, J. (2008). Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. *Livestock Science*, 113(2–3), 144–154.
- Fuller, M.J (2008). *Enciclopedia de Nutrición y Producción Animal*. Acribia. Zaragoza, España. 620 pp.
- Gagliostro, G. A. (2004a). Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y su presencia en alimentos naturales funcionales. 2. Producción de leche alto CLA a través de la suplementación estratégica de la vaca lechera. *Revista Argentina de Producción Animal*. 24:137-163.
- Gagliostro, G.A. (2004b). Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y su presencia en alimentos naturales funcionales. 3. Producción de leche alto CLA a través de la suplementación estratégica de cabra. *Revista Argentina de Producción Animal*. 24:165-185.
- Gagliostro, G. A., & Antonacci, L. (2013). Lácteos funcionales en Santa Fé caso rocío del campo: una leche única para elaboración de productos cualitativamente diferenciados con ventajas para la salud de los consumidores. *Revista Visión Rural*, 99, 19–20.
- Gagliostro, G. A., & Chilliard, Y. (1992). Utilización de lípidos protegidos en la nutrición de vacas lecheras. II. Efectos sobre la concentración plasmática de metabolitos y hormonas, movilización de lípidos corporales y actividad metabólica del tejido adiposo. *Revista Argentina de Producción Animal*, 12, 17–32.
- Gaines, W. L., & Davidson, F. A. (1923). Relation between percentage fat content and yield of milk.
- Gebauer, S. K., Chardigny, J.-M., Jakobsen, M. U., Lamarche, B., Lock, A. L., Proctor, S. D., & Baer, D. J. (2011). Effects of ruminant *trans* fatty acids on cardiovascular disease and cancer: a comprehensive review of epidemiological, clinical, and mechanistic studies. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2(4), 332–354.

- Geleijnse, J. M., Giltay, E. J., Grobbee, D. E., Donders, A. R. T., & Kok, F. J. (2002). Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *Journal of Hypertension*, 20(8), 1493–1499.
- Gervais, R., McFadden, J. W., Lengi, A. J., Corl, B. A., & Chouinard, P. Y. (2009). Effects of intravenous infusion of trans-10, cis-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 5167–5177.
- Givens, D. I., Kliem, K. E., Humphries, D. J., Shingfield, K. J., Morgan, R. 2006. Effect of replacing calcium salts of palm oil distillate with rapeseed oil, milled or whole rapeseeds on milk fatty acid composition in cows fed maize silage-based diets. *Animal*, 3, 1067–1074.
- Givens, D. I., Kliem, K. E., Humphries, D. J., Shingfield, K. J., & Morgan, R. (2009). Effect of replacing calcium salts of palm oil distillate with rapeseed oil, milled or whole rapeseeds on milk fatty-acid composition in cows fed maize silage-based diets. *Animal*, 3(07), 1067–1074.
- Glasser, F., Ferlay, A., & Chilliard, Y. (2008). Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4687–4703.
- Gleissman, H., Johnsen, J. I., & Kogner, P. (2010). Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil? *Experimental Cell Research*, 316(8), 1365–1373.
- Gómez Cortés, P., Juárez Iglesias, M., & Fuente Layos, M. Á. de la. (2010). *Efecto de la suplementación de la dieta ovina con distintas fuentes lipídicas sobre el perfil de ácidos grasos de la leche*.
- Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A. R., Juárez, M., de la Fuente, M. A., & Hervás, G. (2008). Milk production, conjugated linoleic acid content, and in vitro ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1560–1569.
- Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A. R., Juárez, M., de la Fuente, M. A., & Hervás, G. (2009). Effect of supplementation of grazing dairy ewes with a cereal concentrate on animal performance and milk fatty acid profile. *Journal of Dairy Science*, 92(8), 3964–3972.
- Gonthier, C., Mustafa, A. F., Berthiaume, R., Petit, H. V., Martineau, R., & Ouellet, D. R. (2004). Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1854–1863.
- Gonthier, C., Mustafa, A. F., Ouellet, D. R., Chouinard, P. Y., Berthiaume, R., & Petit, H. V. (2005). Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: Effects on blood parameters and milk fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, 88(2), 748–756.
- González, F., & Bas, F. (2002). Efecto de la suplementación con un aceite hidrogenado de pescado sobre la producción de leche en vacas Holstein Friesian. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 29(2), 73–82.
- Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V., & Bauman, D. E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase, 130(9), 2285–2291.
- Groff Funck, L., Barrera-Arellanoy, D., & Mara Block, J. (2006). Ácido linoléico conjugado (CLA) e sua relação com a doença cardiovascular e os fatores de risco associados. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 56(2), 123–134.

- Grummer, R. R. (1990). Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy Science*, 74(9), 3244–3257.
- Guaita, M.S.; Fernández, H.H. (2011). Tablas de composición química de alimentos para rumiantes. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. Argentina. 43 p.
- Hagemeister, H., Precht, D., & Barth, C. A. (1988). Studies on transfer of omega-3 fatty acids into bovine milk fat. *Milchwissenschaft (Germany, FR)*.
- Hamilton, B.A., Ashes, J.R. y Carmichael, A.W. (1992). Effect of formaldehyde-treated sunflower meal on the milk production of grazing dairy cows. *Aust. J. Agric. Res.* 43: 379-387.
- Hamazaki, K., Itomura, M., Huan, M., Nishizawa, H., Watanabe, S., Hamazaki, T., Fujishiro, S. (2003). n-3 long-chain FA decrease serum levels of TG and remnant-like particle-cholesterol in humans. *Lipids*, 38(4), 353–358.
- Hansen, H. O., & Knudsen, J. (1987). Effect of exogenous long-chain fatty acids on lipid biosynthesis in dispersed ruminant mammary gland epithelial cells: esterification of long-chain exogenous fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 70(7), 1344–1349.
- Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology*, 12(3), 204–212.
- Harfoot, C. G. (1978). Lipid metabolism in the rumen. *Progress in Lipid Research*, 17(1), 21–54.
- Harris, W. S. (1996). n-3 fatty acids and lipoproteins: Comparison of results from human and animal studies. *Lipids*, 31(3), 243–252.
- Harrison, J. H., Kincaid, R. L., McNamara, J. P., Waltner, S., Loney, K. A., Riley, R. E., & Cronrath, J. D. (1995). Effect of whole cottonseeds and calcium salts of long-chain fatty acids on performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78(1), 181–193.
- Harvatine, K. J., & Allen, M. S. (2006a). Effects of fatty acid supplements on feed intake, and feeding and chewing behavior of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 1104–1112.
- Harvatine, K. J., & Allen, M. S. (2006b). Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 1081–1091.
- Harvatine, K. J., & Allen, M. S. (2006c). Effects of fatty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 1092–1103.
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 25.
- Hawke, J. C., & Silcock, W. R. (1970). The in vitro rates of lipolysis and biohydrogenation in rumen contents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 218(2), 201-212.
- Heck, J. M. L., van Valenberg, H. J. F., Dijkstra, J., & van Hooijdonk, A. C. M. (2009). Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4745–4755.
- Heravi Moussavi, A., Gilbert, R. O., Overton, T. R., Bauman, D. E., & Butler, W. R. (2007). Effects of feeding fish meal and n-3 fatty acids on ovarian and uterine responses in early lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 145–154.
- Hodgson, J. (1977). Factors limiting herbage intake by the grazing animal. In Proceedings of the International Meeting on Animal Production from Temperate Grassland (pp. 70-75). An Foras Taluntais Dublin.

- Hu, F. B., Manson, J. E., & Willett, W. C. (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(1), 5–19.
- Hu, F. B., Stampfer, M. J., Rimm, E., Ascherio, A., Rosner, B. A., Spiegelman, D., & Willett, W. C. (1999). Dietary fat and coronary heart disease: a comparison of approaches for adjusting for total energy intake and modeling repeated dietary measurements. *American Journal of Epidemiology*, 149(6), 531–540.
- Huang, Y., Schoonmaker, J. P., Bradford, B. J., & Beitz, D. C. (2008). Response of milk fatty acid composition to dietary supplementation of soy oil, conjugated linoleic acid, or both. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 260–270.
- Iorio, J.D., Salado, E.E., González Moreno, Y.M., Curletto, D., Olmeda, M.F., Schmidt, G.C., Plattner, A.E., Palladino, R.A., Scandolo Lucini, D.E. Y Maciel, M.G. (2017). Suplementación con aceite de lino protegido en vacas lecheras: parámetros de estado corporal y metabolitos plasmáticos. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 36 (Supl. 1): 267.
- ISO 15884 IDF 182 (2002). Milk fat-Preparation of fatty acid methyl esters. Geneva, Switzerland: International Standardisation Organisation/International Dairy Federation.
- ISO 15885-IDF. Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography. Switzerland: International Standardisation Organisation/International Dairy Federation.
- ISO 9622 IDF 141 (2013) Milk and Liquid Milk Products—Guidelines for the Application of Mid-Infrared Spectrometry.
- Jenkins, T. C., & Palmquist, D. L. (1984). Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations¹. *Journal of Dairy Science*, 67(5), 978–986.
- Jenkins, T. (1998). The benefits and limitations of fat in dairy rations. In *Proceedings of the Mid-South Ruminant Nutrition Conference*. Texas, USA. Disponible en URL: <http://www.txanc.org/proceedings/1998/benefits.pdf>. Consulta (Vol. 28).
- Jenkins, T. (2004). Challenges of Meeting Cow Demands for Omega Fatty Acids. Presented at the 15th Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, USA.
- Jenkins, T. (2016). What we need to know to improve the utilization of fat in diets. In *Tri-State Dairy Nutrition Conference, 18-20 April 2016, Fort Wayne, Indiana, USA. 25th Anniversary* (pp. 35–48). The Ohio State University. Disponible en: <http://tristatedairy.org/Proceedings%202016/Tom%20Jenkins.pdf>
- Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3851–3863.
- Jenkins, T. C., & Harvathine, K. J. (2014). Lipid feeding and milk fat depression. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30(3), 623–642.
- Jenkins, T. C., & McGuire, M. A. (2006). Major advances in nutrition: impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1302–1310.
- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., & Mosley, E. E. (2007). Board- Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86(2), 397–412.
- Jensen, R. G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 295–350.
- Jouany, J.-P., Lassalas, B., Doreau, M., & Glasser, F. (2007). Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured in vitro. *Lipids*, 42(4), 351–360.

- Kalscheur, K. F., Teter, B. B., Piperova, L. S., & Erdman, R. A. (1997). Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-c18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80(9), 2104–2114.
- Karcagi, R. G., Gaál, T., Ribiczey, P., Huszenicza, G., & Husvéth, F. (2010). Milk production, peripartal liver triglyceride concentration and plasma metabolites of dairy cows fed diets supplemented with calcium soaps or hydrogenated triglycerides of palm oil. *Journal of Dairy Research*, 77(02), 151.
- Katz, I., & Keeney, M. (1966). Characterization of the Octadecenoic Acids in Rumen Digesta and Rumen Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 49(8), 962–966.
- Kaur, G., Cameron-Smith, D., Garg, M., & Sinclair, A. J. (2011). Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 28–34.
- Kay, J. K., Roche, J. R., Kolver, E. S., Thomson, N. A., & Baumgard, L. H. (2005). A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 72(3), 322–332.
- Kelley, N. S., Hubbard, N. E., & Erickson, K. L. (2007). Conjugated Linoleic Acid Isomers and Cancer. *The Journal of Nutrition*, 137(12), 2599–2607.
- Kelly, M. L., Kolver, E. S., Bauman, D. E., Van Amburgh, M. E., & Muller, L. D. (1998). Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81(6), 1630–1636. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75730-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75730-3)
- Kennelly, J. J. (1996). The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Animal Feed Science and Technology*, 60(3–4), 137–152.
- Khanal, R. C., & Olson, K. C. (2004). Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(2), 82–98.
- Khorasani, G. R., & Kennelly, J. J. (1998). Effect of added dietary fat on performance, rumen characteristics, and plasma metabolites of midlactation dairy cows. *Journal of dairy science*, 81(9), 2459–2468.
- Kitessa, S. M., Gulati, S. K., Simos, G. C., Ashes, J. R., Scott, T. W., Fleck, E., & Wynn, P. C. (2004). Supplementation of grazing dairy cows with rumen-protected tuna oil enriches milk fat with n-3 fatty acids without affecting milk production or sensory characteristics. *British Journal of Nutrition*, 91(02), 271. <https://doi.org/10.1079/BJN20031050>
- Kliem, K. E., & Shingfield, K. J. (2016). Manipulation of milk fatty acid composition in lactating cows: Opportunities and challenges: Manipulation of milk fat: opportunities and challenges. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(11), 1661–1683.
- Koba, K., & Yanagita, T. (2014). Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obesity Research & Clinical Practice*, 8(6), e525–e532.
- Komaragiri, M. V., Casper, D. P., & Erdman, R. A. (1998). Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 2. Effect of dietary fat on mobilization of body fat and protein. *Journal of Dairy Science*, 81(1), 169–175.
- Komarek, A. R. (1993). A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. *J. Dairy Sci*, 76(Suppl 1), 250.
- Koolman, J., & Röhm, K.-H. (2005). *Bioquímica: texto y atlas*. Ed. Médica Panamericana.

- Kraft, J., Collomb, M., Möckel, P., Sieber, R., & Jahreis, G. (2003). Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids*, 38(6), 657–664.
- La Guardia, M., S, G., G, T., E, T., & M, G. (2005). Omega 3 fatty acids: biological activity and effects on human health. *Panminerva Medica*, 47(4), 245–257.
- Lammers, B.P., D.R. Buckmaster & J.A Heinrichs. (1996). A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *Journal of Dairy Science* 79: 922-928.
- Larsen, M. K., Nielsen, J. H., Butler, G., Leifert, C., Slots, T., Kristiansen, G. H., & Gustafsson, A. H. (2010). Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 2863–2873.
- Lauritzen, L. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Research*, 40(1–2), 1–94.
- Lawless, F., Murphy, J. J., Harrington, D., Devery, R., & Stanton, C. (1998). Elevation of Conjugated cis-9, trans-11-Octadecadienoic Acid in Bovine Milk Because of Dietary Supplementation. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3259–3267.
- Lerch, S., Ferlay, A., Shingfield, K. J., Martin, B., Pomiès, D., & Chilliard, Y. (2012). Rapeseed or linseed supplements in grass-based diets: Effects on milk fatty acid composition of Holstein cows over two consecutive lactations. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5221–5241.
- Lerch, S., Shingfield, K. J., Ferlay, A., Vanhatalo, A., & Chilliard, Y. (2012). Rapeseed or linseed in grass-based diets: Effects on conjugated linoleic and conjugated linolenic acid isomers in milk fat from Holstein cows over 2 consecutive lactations. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 7269–7287.
- Lock, A. L., & Bauman, D. E. (2004). Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, 39(12), 1197–1206.
- Lock, A. L., Harvatine, K. J., Drackley, J. K., & Bauman, D. E. (2006). Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. In *Proc. Intermountain Nutr. Conf* (pp. 85–100). Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/James_Drackley/publication/266499830_Concepts_of_fat_and_fatty_acid_digestion_in_ruminants/links/54b6784e0cf2bd04be32135f.pdf
- Lock, A. L., Harvatine, K. J., Ipharraguerre, I. R., Van Amburgh, M. E., Drackley, J. K., & Bauman, D. E. (2005). The dynamics of fat digestion in lactating dairy cows: what does the literature tell us. In *Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf., Cornell Univ., Ithaca, NY* (pp. 83–94). Disponible en: <ftp://173.183.201.52/Inetpub/wwwroot/DairyWeb/Resources/CNC2005/Lock.pdf>
- Loor, J. J., Ferlay, A., Ollier, A., Ueda, K., Doreau, M., & Chilliard, Y. (2005). High-concentrate diets and polyunsaturated oils alter trans and conjugated isomers in bovine rumen, blood, and milk. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3986–3999.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., & Wallace, R. J. (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4(7), 1008–1023.
- Luna, P., Juárez, M., & De la Fuente, M. A. (2005). Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3377–3381.
- Lunn, J., & Theobald, H. E. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin*, 31(3), 178–224.

- Macdonald, K. A., Verkerk, G. A., Thorrold, B. S., Pryce, J. E., Penno, J. W., McNaughton, L. R., ... Holmes, C. W. (2008). a comparison of three strains of holstein-friesian grazed on pasture and managed under different feed allowances. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1693–1707.
- Maddock TD, Anderson VL. & Lardy GP. (2005). Using flax in livestock diets. NDSU Extension 356 Service.
- Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Figueres, L., & Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(4), 303–314.
- Makarem, N., Chandran, U., Bandera, E. V., & Parekh, N. (2013). Dietary fat in breast cancer survival. *Annual Review of Nutrition*, 33(1), 319–348.
- Marín, M., L. A., Pérez Hernández, M., Alba, P., M, L., Carrión Pardo, D., I, A. (2013). Efecto de los aceites y semillas en dietas para rumiantes sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(3), 319–338.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J. P., Doreau, M., & Chilliard, Y. (2008). Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science*, 86(10), 2642–2650.
- Martin, J.-C., & Valeille, K. (2002). Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function. *Reproduction Nutrition Development*, 42(6), 525–536.
- Martínez Marín, A. L. (2010). Digestión de los lípidos en los rumiantes: una revisión. *Interciencia*, 35(4), 240–246.
- Martínez Marín, A. L., Pérez Hernández, M., Alba, P., Luis, M., Carrión Pardo, D., Garzón Sigler, A. I., & Gómez Castro, G. (2013). Fat addition in the diet of dairy ruminants and its effects on productive parameters. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26(2), 69–78.
- Martínez Marín, A. L., Pérez Hernández, M., Pérez Alba, L., Gómez Castro, G., & Garzón Sígler, A. I. (2010). Efecto de la grasa de la dieta sobre la grasa láctea de los rumiantes: una revisión. *Interciencia*, 35(10).
- Mataix Verdú, J. (2004). *Libro blanco de los Omega-3: los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 y monoin tipo oleico y su papel en la salud*. Ed. Médica Panamericana.
- Maxin, G., Rulquin, H., & Glasser, F. (2011). Response of milk fat concentration and yield to nutrient supply in dairy cows. *Animal*, 5(08), 1299–1310.
- McNamara, S., Butler, T., Ryan, D., Mee, J., Dillon, P., O'Mara, F., Murphy, J. (2003). Effect of offering rumen-protected fat supplements on fertility and performance in spring-calving Holstein–Friesian cows. *Animal Reproduction Science*, 79(1–2), 45–56.
- Medeiros, S. R., Oliveira, D. E., Aroeira, L. J. M., McGuire, M. A., Bauman, D. E., & Lanna, D. P. D. (2010). Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid to grazing cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 1126–1137.
- Meguid, N. A., Atta, H. M., Gouda, A. S., & Khalil, R. O. (2008). Role of polyunsaturated fatty acids in the management of Egyptian children with autism. *Clinical Biochemistry*, 41(13), 1044–1048.
- Meijs, J.A.C., Walters, R.J.K. y Keen, A. 1982. Sward methods. En: Leaver J.D. (ed) *Herbage intake handbook*. The British Grassland Society, Grassland Research Institute, Hurley, U.K. pp. 11-37.
- Melo, V., Ruiz, V. M., & Cuamatzi, O. (2007). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Reverte.

- Mensink, R. P., & Katan, M. B. (1990). Effect of Dietary trans Fatty Acids on High-Density and Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Healthy Subjects. *New England Journal of Medicine*, 323(7), 439–445.
- Merendino, N., Costantini, L., Manzi, L., Molinari, R., D'Eliseo, D., & Velotti, F. (2013). Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acid dha: a potential adjuvant in the treatment of cancer. *BioMed Research International*, 2013, 1–11.
- Miles, E. A., & Calder, P. C. (2012). Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *British Journal of Nutrition*, 107(S2), S171–S184.
- Minson, D.J. (1990). Forage in ruminant nutrition. Academic Press Inc., San Diego, California, 482 pp.
- Moallem, U. (2009). The effects of extruded flaxseed supplementation to high-yielding dairy cows on milk production and milk fatty acid composition. *Animal Feed Science and Technology*, 152(3–4), 232–242.
- Moallem, U., Folman, Y., & Sklan, D. (2000). Effects of somatotropin and dietary calcium soaps of fatty acids in early lactation on milk production, dry matter intake, and energy balance of high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 2085–2094.
- Moloney, F., Yeow, T.-P., Mullen, A., Nolan, J. J., & Roche, H. M. (2004). Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4), 887–895.
- Moore, C. E., Kay, J. K., Collier, R. J., VanBaale, M. J., & Baumgard, L. H. (2005). Effect of supplemental conjugated linoleic acids on heat-stressed Brown Swiss and Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1732–1740.
- Murphy, J. J., & O'Mara, F. (1993). Nutritional manipulation of milk protein concentration and its impact on the dairy industry. *Livestock Production Science*, 35(1–2), 117–134.
- Murphy, J. L., Jones, A., Brookes, S., & Wootton, S. A. (1995). The gastrointestinal handling and metabolism of palmitic acid in healthy women. *Lipids*, 30(4), 291–298.
- Mustafa, A. F., McKinnon, J. J., Christensen, D. A., & He, T. (2002). Effects of micronization of flaxseed on nutrient disappearance in the gastrointestinal tract of steers. *Animal Feed Science and Technology*, 95(3–4), 123–132.
- Nagao, K., Wang, Y.-M., Inoue, N., Han, S.-Y., Buang, Y., Noda, T., ... Yanagita, T. (2003). The 10trans, 12cis isomer of conjugated linoleic acid promotes energy metabolism in OLETF rats. *Nutrition*, 19(7–8), 652–656.
- National Research Council (U.S.) (Ed.). (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle* (7th rev. ed). Washington, D.C: National Academy Press.
- Neveu, C., Baurhoo, B., & Mustafa, A. (2014). Effect of feeding extruded flaxseed with different grains on the performance of dairy cows and milk fatty acid profile. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1543–1551.
- Noakes, M., P. J. Nestel, and P. M. Clifton. (1996). Modifying the fatty acid profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. *American Journal of Clinical Nutrition*. 63:42–46
- O'Donnell, J. A. (1989). Milk Fat Technologies and Markets: A Summary of the Wisconsin Milk Marketing Board 1988 Milk Fat Roundtable. *Journal of Dairy Science*, 72(11), 3109–3115.

- Offer, N. W., Marsden, M., Dixon, J., Speake, B. K., & Thacker, F. E. (1999). Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 poly-unsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. *Animal Science*, 69(03), 613–625.
- Olmeda, M.F., Moreno, Y.M., Iorio, J.D., Curletto, D., Palladino, R.A., Scandolo, D.E., Maciel, M.G. y Salado, E.E. (2017). La suplementación con aceite de lino protegido altera el comportamiento en pastoreo y el consumo de materia seca de vacas lecheras. 40° Congreso Argentino de Producción Animal.
- OMS. (2017a). Enfermedades cardiovasculares. Retrieved June 7, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
- OMS. (2017b). Enfermedades no transmisibles. Retrieved May 5, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
- Onetti, S. ., & Grummer, R. . (2004). Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: a meta-analysis of literature. *Animal Feed Science and Technology*, 115(1–2), 65–82.
- OPS/OMS. (2016). *Argentina mejora en reducción de consumo de tabaco, exposición al humo e ingesta de sal, pero sigue en un preocupante nivel sobrepeso y obesidad*. Retrieved from http://www.paho.org/arg/index.php?option=com_content&view=article&id=9767:argentina-reduccion-consumo-tabaco-sal-sobrepeso-obesidad&catid=333:arg03-salud-familiar-y-comunitaria&Itemid=227
- Pabón Restrepo, M. L. (2004). *Bioquímica ruminal*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from https://books.google.com/books/about/Notas_de_clase_Bioqu%C3%ADmica_ruminal.html?hl=es&id=LA-9LjyvOQIC
- Palladino, R. A., Buckley, F., Prendiville, R., Murphy, J. J., Callan, J., & Kenny, D. A. (2010). A comparison between Holstein-Friesian and Jersey dairy cows and their F1 hybrid on milk fatty acid composition under grazing conditions. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 2176–2184.
- Palmquist, D. L. (1984). Use of fats in diets for lactating dairy cows. *Proceedings-Easter School in Agricultural Science, University of Nottingham*.
- Palmquist, D. (1994). The role of dietary fats in efficiency of ruminants. *The Journal of Nutrition*, 124(8 Suppl), 1377S–1382S.
- Palmquist, D. L. (1996). Utilización de lípidos en dietas de rumiantes, 12. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Don_Palmquist/publication/28180431_Utilizacion_de_lipidos_en_dietas_de_rumiantes/links/0c96051811d213d3b0000000.pdf
- Palmquist, D. L. (2006). Milk Fat: Origin of Fatty Acids and Influence of Nutritional Factors Thereon. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 43–92). Boston, MA: Springer US.
- Palmquist, D. L., & Jenkins, T. C. (1980). Fat in Lactation Rations1, 2: Review. *Journal of Dairy Science*, 63(1), 1–14.
- Palmquist, D. L., Lock, A. L., Shingfield, K. J., & Bauman, D. E. (2005). Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 50, pp. 179–217). Elsevier.
- Pantoja, J., Custodio, A. A., Randel, P. F., Cianzio, S., & Rodríguez, B. (1996). Milk production and somatic cell count in complete lactations in dairy herds in Puerto Rico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 80(3), 169–181.

- Pantoja, J., Firkins, J. L., Eastridge, M. L., & Hull, B. L. (1994). Effects of fat saturation and source of fiber on site of nutrient digestion and milk production by lactating dairy cows 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 77(8), 2341–2356.
- Pariza, M. W., Park, Y., & Cook, M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 40(4), 283–298.
- Park, Y., & Pariza, M. W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International*, 40(3), 311–323.
- Park, Y., & Pariza, M. W. (2009, June). Bioactivities and potential mechanisms of action for conjugated fatty acids. Disponible: May 17, 2017, <http://www.dbpia.co.kr>
- Park, Y., Storkson, J. M., Albright, K. J., Liu, W., & Pariza, M. W. (1999). Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*, 34(3), 235–241.
- Parletta, N., Milte, C. M., & Meyer, B. J. (2013). Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(5), 725–743.
- Parodi, P. W. (1999). Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1339–1349.
- Perera, H., Jeewandara, K. C., Seneviratne, S., & Guruge, C. (2012). Combined 3 and 6 supplementation in children with attention-deficit hyperactivity disorder (adhd) refractory to methylphenidate treatment: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Child Neurology*, 27(6), 747–753.
- Perfield, J. W., Bernal-Santos, G., Overton, T. R., & Bauman, D. E. (2002). Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2609–2617.
- Petit, H. V. (2002). Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1482–1490.
- Petit, H. V. (2003). Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed formaldehyde treated flaxseed or sunflower seed. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2637–2646.
- Petit, H. V. (2010). Review: Feed intake, milk production and milk composition of dairy cows fed flaxseed. *Canadian Journal of Animal Science*.
- Petit, H. V., & Benchaar, C. (2007). Milk production, milk composition, blood composition, and conception rate of transition dairy cows fed different profiles of fatty acids. *Canadian Journal of Animal Science*, 87(4), 591–600.
- Petit, H. V., & Côrtes, C. (2010). Milk production and composition, milk fatty acid profile, and blood composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed in the first half of lactation. *Animal Feed Science and Technology*, 158(1–2), 36–43.
- Petit, H. V., Dewhurst, R. J., Proulx, J. G., Khalid, M., Haresign, W., Twagiramungu, H., & others. (2001). Milk production, milk composition, and reproductive function of dairy cows fed different fats. *Canadian Journal of Animal Science*, 81(2), 263–271.
- Petit, H. V., Dewhurst, R. J., Scollan, N. D., Proulx, J. G., Khalid, M., Haresign, W., Mann, G. E. (2002). Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *Journal of Dairy Science*, 85(4), 889–899.
- Petit, H. V., & Gagnon, N. (2009). Milk concentrations of the mammalian lignans enterolactone and enterodiols, milk production, and whole tract digestibility of dairy cows fed diets containing different concentrations of flaxseed meal. *Animal Feed Science and Technology*, 152(1–2), 103–111.

- Petit, H. V., Germiquet, C., & Lebel, D. (2004). Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(11), 3889–3898.
- Petridou, A., Mougios, V., & Sagredos, A. (2003). Supplementation with CLA: Isomer incorporation into serum lipids and effect on body fat of women. *Lipids*, 38(8), 805–811.
- Poppi, D. P., Hughes, T. P., & L'Huillier, P. J. (1987). Intake of pasture by grazing ruminants. In 'Livestock feeding on pasture'. (Ed. AM Nichol) pp. 55–63. *New Zealand Society of Animal Production, Occasional Publication*, (10).
- Rabiee, A. R., Breinhild, K., Scott, W., Golder, H. M., Block, E., & Lean, I. J. (2012). Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 3225–3247.
- Rabiee, A. R., Lean, I. J., Stevenson, M. A., & Socha, M. T. (2010). Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 93(9), 4239–4251.
- Rabionet, M., Gorgas, K., & Sandhoff, R. (2014). Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(3), 422–434.
- Racine, N. M., Watras, A. C., Carrel, A. L., Allen, D. B., McVean, J. J., Clark, R. R., choeller, D. A. (2010). Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1157–1164.
- Raes, K., De Smet, S., Balcaen, A., Claeys, E., & Demeyer, D. (2003). Effect of diets rich in N-3 polyunsaturated fatty acids on muscle lipids and fatty acids in Belgian Blue double-muscled young bulls. *Reproduction Nutrition Development*, 43(4), 331–345.
- Rego, O. A., Rosa, H. J. D., Portugal, P., Cordeiro, R., Borba, A. E. S., Vouzela, C. M., & Bessa, R. J. B. (2005). Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid, omega-3 and other fatty acids in milk fat from grazing dairy cows. *Livestock Production Science*, 95(1–2), 27–33.
- Reis, M. M., Cooke, R. F., Ranches, J., & Vasconcelos, J. L. M. (2012). Effects of calcium salts of polyunsaturated fatty acids on productive and reproductive parameters of lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 7039–7050.
- Relling, A. E., & Reynolds, C. K. (2007). Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1506–1515.
- Rennó, F. P., Freitas Júnior, J. E. de, Gandra, J. R., Maturana Filho, M., Verdurico, L. C., Rennó, L. N., ... Vilela, F. G. (2014). Effect of unsaturated fatty acid supplementation on digestion, metabolism and nutrient balance in dairy cows during the transition period and early lactation. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(4), 212–223.
- Rennó, F. P., Freitas Júnior, J. E. de, Gandra, J. R., Verdurico, L. C., Santos, M. V. dos, Barletta, R. V., Vilela, F. G. (2013). Fatty acid profile and composition of milk protein fraction in dairy cows fed long-chain unsaturated fatty acids during the transition period. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(11), 813–823.
- Ribeiro, J. D. S., Gonçalves, T. D. M., Ladeira, M. M., Tullio, R. R., Campos, F. R., Bergmann, J. A. G., & Carvalho, J. R. R. D. (2012). Reactivity, performance,

- color and tenderness of meat from Zebu cattle finished in feedlot. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(4), 1009-1015.
- Ribeiro, C., Oliveira, D. E., Juchem, S. O., Silva, T. M., & Nalério, É. S. (2011). Fatty acid profile of meat and milk from small ruminants: a review. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1), S121–S137.
- Rico, D. E., Ying, Y., & Harvatine, K. J. (2014). Comparison of enriched palmitic acid and calcium salts of palm fatty acids distillate fat supplements on milk production and metabolic profiles of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5637–5644.
- Riserus, U., Arner, P., Brismar, K., & Vessby, B. (2002). Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 25(9), 1516–1521.
- Riserus, U., Vessby, B., Arner, P., & Zethelius, B. (2004). Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia*, 47(6).
- Rivera, V. M. R. (2008). *Bases de la Alimentación Humana*. Netbiblo.
- Rodriguez, N.M., Saliba, E.O. y Guimaraes-Junior, R. 2007. Use of parameters for estimation of forage consumption and digestibility. Purified enriched lignin, LIPE. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 20: 518-525.
- Roca-Fernández, A. I., O'Donovan, M. A., Curran, J., & González-Rodríguez, A. (2011). Effect of pre-grazing herbage mass and daily herbage allowance on perennial ryegrass swards structure, pasture dry matter intake and milk performance of Holstein-Friesian dairy cows. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(1), 86–99.
- Roy, A., Chardigny, J.-M., Bauchart, D., Ferlay, A., Lorenz, S., Durand, D., Chilliard, Y. (2007). Butters rich either in trans-10-C18:1 or in trans-11-C18:1 plus cis-9, trans-11 CLA differentially affect plasma lipids and aortic fatty streak in experimental atherosclerosis in rabbits. *Animal*, 1(03), 467.
- Ryder, J. W., Portocarrero, C. P., Song, X. M., Cui, L., Yu, M., Combatsiaris, T., Houseknecht, K. L. (2001). Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid: improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and ucp-2 gene expression. *Diabetes*, 50(5), 1149–1157.
- Salado, E. E. (2000). *Reemplazo de grano de maíz por lípidos protegidos en vacas lecheras en pastoreo y en inicio de lactancia*. Balcarce. M.Sc. Thesis. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar de Plata, Argentina. 101 pp.
- Salado, E.E., Bretschneider, G., Cuatrin, A., Carassai, A., Espiñeira, M. y Haedo, E. (2010). Suplementación de vacas lecheras en pastoreo con niveles crecientes de concentrado energético: 1. *Producción y composición de leche*. *Revista Argentina de Producción Animal*, 30 (supl. 1): 520-521.
- Salado, E.E., Bretschneider, G., Cuatrin, A., Descalzo, A.M. and Gagliostro, G.A. (2017). Milk yield and composition and pasture ruminal digestion in grazing dairy cows receiving three levels of energy concentrate supplementation. *Agricultural Sciences*, 8, 1135-1156.
- Salado, E. E., Gagliostro, G. A., Becu-Villalobos, D., & Lacau-Mengido, I. (2004). Partial replacement of corn grain by hydrogenated oil in grazing dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 87(5), 1265–1278.
- Saliba E.O.S, Pereira R.N, Ferreira W.M. (2003). Lignin from *Eucalyptus grandis* as indicator for rabbits in digestibility trials. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 3:1-3.a (Special volume).

- Saliba, E.O.S., Faria, E.P., Rodriguez, N.M., Moreira, G.R., Sampaio, I.B.M., Saliba, J.S., Gonçalves, L.C., Borges, I. y Borges, A.L.C.C. (2015). Use of Infrared Spectroscopy to Estimate Fecal Output with Marker Lipe®. *International Journal of Food Science and Nutrition Diet*, 54:001, 1-10.
- Salminen, I., Mutanen, M., Jauhiainen, M., & Aro, A. (1998). Dietary trans fatty acids increase conjugated linoleic acid levels in human serum. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(2), 93–98.
- Santana, M.C.A.; Vieira, B.R.; Costa, D.F.; Dian, P.H.M.; Fiorentini, G.; Canesin, R.C.; Pereira, G.T.; Reis, R.A. y Berchielli, T.T. (2015). Source and frequency of dry season lipid supplementation of grazing finishing cattle. *Animal Production Science* 55: 745–751.
- Santos, S.A., Filho, S.C.V., Detmann, E., Valadares, R.F.D., Ruas, J.R.M. y Amaral, P.M. (2011). Different forage sources for F1 Holstein×Gir dairy cows. *Livestock Science*, 142: 48–58.
- Santos, S.A., Filho, S.C.V., Detmann, E., Valadares, R.F.D., Ruas, J.R.M., Prados, L.F. y Vega, D.S.M. (2012). Voluntary intake and milk production in F1 Holstein×zebu cows in confinement. *Tropical Animal Health and Production*, 44:1303–1310.
- SAS Institute Inc. 2010. SAS/STAT® User's Guide (2002-2010). SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Schingoethe, D. J., Brouk, M. J., Lightfield, K. D., & Baer, R. J. (1996). Lactational responses of dairy cows fed unsaturated fat from extruded soybeans or sunflower seeds. *Journal of Dairy Science*, 79(7), 1244–1249.
- Schingoethe, D. J., & Casper, D. P. (1991). Total lactational response to added fat during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 74(8), 2617–2622.
- Schrezenmeir, J., & Jagla, A. (2000). Milk and diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(sup2), 176S–190S.
- Schroeder, G. F., Delahoy, J. E., Vidaurreta, I., Bargo, F., Gagliostro, G. A., & Muller, L. D. (2003). Milk fatty acid composition of cows fed a total mixed ration or pasture plus concentrates replacing corn with fat, 86(10), 3237–3248.
- Schroeder, G.F., Elizalde, J.C. y Fay, J.P. (2000). Caracterización del valor nutritivo de los silajes de maíz producidos en la Provincia de Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 20, N° 3-4: 161-177.
- Schroeder, G. F., Gagliostro, G. A., Bargo, F., Delahoy, J. E., & Muller, L. D. (2004). Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livestock Production Science*, 86(1), 1–18.
- Schroeder, G. F., Gagliostro, G. A., Becu-Villalobos, D., & Lacau-Mengido, I. (2002). Supplementation with partially hydrogenated oil in grazing dairy cows in early lactation, 85(3), 580–594.
- Scollan, N. D., Dhanoa, M. S., Choi, N. J., Maeng, W. J., Enser, M., & Wood, J. D. (2001). Biohydrogenation and digestion of long chain fatty acids in steers fed on different sources of lipid. *The Journal of Agricultural Science*, 136(03). <https://doi.org/10.1017/S0021859601008796>
- Scott, T. W., Cook, L. J., Ferguson, K. A., McDonald, I. W., Buchanan, R. A., & Loftus, H. (1970). Production of poly-unsaturated milk fat in domestic ruminants. *Australian Journal of Science*, 32(7), 291-93.
- Secchiari, P., Antongiovanni, M., Mele, M., Serra, A., Buccioni, A., Ferruzzi, G., Petacchi, F. (2003). Effect of kind of dietary fat on the quality of milk fat from Italian Friesian cows. *Livestock Production Science*, 83(1), 43–52.

- Selberg, K. T., Lowe, A. C., Staples, C. R., Luchini, N. D., & Badinga, L. (2004). Production and metabolic responses of periparturient Holstein cows to dietary conjugated linoleic acid and trans-octadecenoic acids. *Journal of Dairy Science*, 87(1), 158–168.
- Serra, A., Mele, M., La Comba, F., Conte, G., Buccioni, A., & Secchiari, P. (2009). Conjugated Linoleic Acid (CLA) content of meat from three muscles of Massese suckling lambs slaughtered at different weights. *Meat Science*, 81(2), 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.09.001>
- Shibata, H., Hashizume, N., Gazi, M. R., Sera, K., Kato, E., Ohmori, T., ... Itabashi, H. (2011). Effect of supplementation of soy sauce oil and Ca salts of fatty acids on rumen fermentation, milk production and conjugated linoleic acid in milk of dairy cows: soy sauce oil on milk production and cla. *Animal Science Journal*, 82(4), 554–559.
- Shingfield, K. J., Bernard, L., Leroux, C., & Chilliard, Y. (2010). Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*, 4(07), 1140–1166.
- Shingfield, K. J., & Grinari, J. M. (2007). Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 799–816.
- Silva, S. D. L., Leme, P. R., Putrino, S. M., Pereira, A. S. C., Valinote, A. C., Nogueira Filho, J. C. M., & Lanna, D. P. D. (2009). Fatty acid composition of intramuscular fat from Nellore steers fed dry or high moisture corn and calcium salts of fatty acids. *Livestock Science*, 122(2-3), 290–295.
- Simopoulos, A. P. (1999). Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 60(5–6), 421–429.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8), 365–379.
- Simopoulos, A. P. (2004). Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Reviews International*, 20(1), 77–90.
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9), 502–507.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233(6), 674–688.
- Smith, S. B., Smith, D. R. (1995). Substrate utilization in ruminant adipose tissues. *The biology of fat in animal nutrition. Am Soc Animal Sci. Champaign, IL*, 166–182.
- Soyeurt, H., Dardenne, P., Dehareng, F., Bastin, C., & Gengler, N. (2008). Genetic parameters of saturated and monounsaturated fatty acid content and the ratio of saturated to unsaturated fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3611–3626.
- Soyeurt, H., Dardenne, P., Gillon, A., Croquet, C., Vanderick, S., Mayeres, P., Gengler, N. (2006). Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4858–4865.
- Spiller, G. A. (1995). *Handbook of Lipids in Human Nutrition*. CRC Press.
- St John, L. C., Lunt, D. K., & Smith, S. B. (1991). Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneous adipose tissue microsomes. *Journal of Animal Science*, 69(3), 1064.
- Stevens, C. (1990). Choosing a protected fat for ruminant diets. *Feed Compounder*, 10(7), 58–59.

- Stockdale, C. R., Walker, G. P., Wales, W. J., Dalley, D. E., Birkett, A., Shen, Z., & Doyle, P. T. (2003). Influence of pasture and concentrates in the diet of grazing dairy cows on the fatty acid composition of milk. *Journal of Dairy Research*, 70(3), 267–276.
- Stoffel, C. M., Crump, P. M., & Armentano, L. E. (2015). Effect of dietary fatty acid supplements, varying in fatty acid composition, on milk fat secretion in dairy cattle fed diets supplemented to less than 3% total fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 431–442.
- Su, K.-P., Huang, S.-Y., Chiu, C.-C., & Shen, W. W. (2003). Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 13(4), 267–271.
- Sukhija, P. S., & Palmquist, D. L. (1990). Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. *Journal of Dairy Science*, 73(7), 1784–1787.
- Suksombat, W., Meeprom, C., & Mirattanaphrai, R. (2013). Milk production, milk composition, weight change and milk fatty acid composition in lactating dairy cows in response to whole linseed supplementation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(8), 1111–1118.
- Sultana, H., Ishida, T., Shintaku, T., Kanda, S., & Itabashi, H. (2008). Effect of feeding Ca-salts of fatty acids from soybean oil and linseed oil on c9, t11-CLA production in ruminal fluid and milk of Holstein dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 21, 1262–1270.
- Tamminga, S., & Doreau, M. (1991). Lipids and rumen digestion. *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. Paris: Institut National de La Recherche Agronomique, 151–164.
- Thanh, L. P., & Suksombat, W. (2015). Milk yield, composition, and fatty acid profile in dairy cows fed a high-concentrate diet blended with oil mixtures rich in polyunsaturated fatty acids. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(6), 796–806.
- Theurer, M. L., Block, E., Sanchez, W. K., & McGuire, M. A. (2009). Calcium salts of polyunsaturated fatty acids deliver more essential fatty acids to the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 2051–2056.
- Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and forage science*, 18(2), 104–111.
- Tyrrell, H. F., & Reid, J. T. (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *Journal of Dairy Science*, 48(9), 1215–1223.
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985–992.
- Van Nevel, C. J., & Demeyer, D. I. (1996). Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reproduction Nutrition Development*, 36(1), 53–63.
- Vanhatalo, A., Kuoppala, K., Toivonen, V., & Shingfield, K. J. (2007). Effects of forage species and stage of maturity on bovine milk fatty acid composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 856–867.
- Vaughan, V. C., Hassing, M.-R., & Lewandowski, P. A. (2013). Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 108(3), 486–492.
- Velásquez, G. (2006). *Fundamentos de alimentación saludable*. Universidad de Antioquia.
- Verité, R., & Journet, M. (1970). Facteurs qui limitent prise de vaches de la laiterie. *Annales de Zootechnique*, 19(1), 265–278.

- von Schacky, C. (2008). Omega-3 fatty acids: antiarrhythmic, proarrhythmic or both: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11(2), 94–99.
- Wang, Y.-M., Nagao, K., Inoue, N., Ujino, Y., Shimada, Y., Nagao, T., Yanagita, T. (2006). Isomer-specific anti-obese and hypolipidemic properties of conjugated linoleic acid in obese oltf rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(2), 355–362.
- Ward, A. T., Wittenberg, K. M., & Przybylski, R. (2002). Bovine milk fatty acid profiles produced by feeding dietscontaining solin, flax and canola. *Journal of Dairy Science*, 85(5), 1191–1196.
- Webb, E. C., Casey, N. H., & Simela, L. (2005). Goat meat quality. *Small Ruminant Research*, 60(1–2), 153–166.
- Weiss, W. P., & Pinos-Rodríguez, J. M. (2009). Production responses of dairy cows when fed supplemental fat in low- and high-forage diets. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 6144–6155.
- White, S. L., Bertrand, J. A., Wade, M. R., Washburn, S. P., Green, J. T., & Jenkins, T. C. (2001). Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2295–2301.
- Wijendran, V., & Hayes, K. C. (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, 24(1), 597–615.
- Wildman, E. E., Jones, G. M., Wagner, P. E., Boman, R. L., Troutt, H. F., & Lesch, T. N. (1982). A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*, 65(3), 495–501.
- Willett, W. (1993). Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *The Lancet*, 341(8845), 581–585.
- Williams, C. M. (2000). Dietary fatty acids and human health. In *Annales de Zootechnie* (Vol. 49, pp. 165–180). EDP Sciences. Disponible en: <http://animres.edpsciences.org/articles/animres/abs/2000/03/z0301/z0301.html>
- Wina, E., Widiawaty, Y., Tangendjaja, B., & Susana, I. (2015). Supplementation of calcium-fatty acid to lactating cow to increase milk production and performance of dairy cow. *Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner*, 19(4).
- Wu, Z., & Huber, J. T. (1994). Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: a review. *Livestock Production Science*, 39(2), 141–155.
- Wu, Z., Ohajuruka, O. A., & Palmquist, D. L. (1991). Ruminal Synthesis, Biohydrogenation, and Digestibility of Fatty Acids by Dairy Cows1. *Journal of Dairy Science*, 74(9), 3025–3034.
- Yang, M., & Cook, M. E. (2016). Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- α production, and modifies splenocyte cytokines production. *Experimental Biology and Medicine*.
- Zebeli, Q., Mansmann, D., Steingass, H., & Ametaj, B. N. (2010). Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livestock Science*, 127(1), 1-10.
- Zebeli, Q., Aschenbach, J. R., Tafaj, M., Boguhn, J., Ametaj, B. N., & Drochner, W. (2012). Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1041-1056.
- Zebeli, Q., Tafaj, M., Steingass, H., Metzler, B., & Drochner, W. (2006). Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early

lactating dairy cows fed total mixed rations. *Journal of dairy science*, 89(2), 651-668.

Zheng, X., Tocher, D. R., Dickson, C. A., Bell, J. G., & Teale, A. J. (2005). Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a $\Delta 6$ desaturase of Atlantic salmon. *Lipids*, 40(1), 13–24.